



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Química e Ingeniería Química

Escuela Profesional de Química

**Inmovilización enzimática de papaína en soporte
esferular de quitosano y determinación comparativa de
su actividad enzimática sobre la caseína**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico

AUTOR

Agustin Angel RODRIGUEZ LLEGADO

ASESOR

Mario CERONI GALLOSO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Rodríguez, A. (2019). *Inmovilización enzimática de papaína en soporte esférico de quitosano y determinación comparativa de su actividad enzimática sobre la caseína*. Tesis para optar el título profesional de Químico. Escuela Profesional de Química, Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del asesor:	Dr. Mario Ceroni Galloso (0000-0002-8736-2359)
D.N.I. del autor:	45512642 (Agustin Angel Rodriguez Llegado)
Grupo de investigación:	Fisicoquímica Teórica y Aplicada (FIQUITA)
Institución que financia parcialmente la investigación:	Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Ciudad Universitaria Pabellón B. Av. Venezuela S/N Lima 01, Perú. // Av. República de Venezuela s/n, Cercado de Lima 15081.
Año o rango de años que la investigación abarcó	2 años (2017 – 2018)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA

Central: 619 7000 anexos 1230 Telefax: 1209
Ciudad Universitaria – Calle Germán Amezaga 375 – Lima 1
“Año de la lucha contra la corrupción e impunidad”

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los suscritos miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Química, bajo la Presidencia del **Dr. Julio César Santiago Contreras** (Presidente), la **Quím. Marta Margot** (Miembro) y el **Dr. Mario Ceroni Galloso** (Asesor), habiendo presentado para tal efecto la **TESIS**, titulada **“INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA DE PAPAÍNA EN SOPORTE ESFERULAR DE QUITOSANO Y DETERMINACIÓN COMPARATIVA DE SU ACTIVIDAD ENZIMÁTICA SOBRE LA CASEÍNA”**, después de **SUSTENTADA Y APROBADA** la **TESIS** elaborado por el Bachiller en Química: **AGUSTIN ANGEL RODRIGUEZ LLEGADO**; para optar el **TÍTULO PROFESIONAL de QUÍMICO**, acordaron calificarlo con la **NOTA** de:

Diecinueve

(LETRA)

19

(NÚMERO)

Ciudad Universitaria, 25 de julio de 2019.

Dr. JULIO CÉSAR SANTIAGO CONTRERAS
PRESIDENTE

Quím. MARTA MARGOT BRAVO AYALA
MIEMBRO

Dr. MARIO CERONI GALLOSO
ASESOR

Dra. THAIS CLEOFÉ LINARES FUENTES
DIRECTORA (e) DE LA E.P. DE QUÍMICA



A mis padres, hermana y a todos los que hicieron este deseo posible.

AGRADECIMIENTO

En primera instancia agradezco a Dios por permitirme vivir experiencias llenas de libertad humana y de aprendizaje en momentos personales como profesionales.

Del mismo modo agradezco a mis padres y a mi hermana por haber sido incondicionales en su apoyo en el transcurso del desarrollo de este estudio.

Agradezco al Dr. Jesús Américo Cjuno Huanca, por haberme acompañado con su asesoría desde los inicios de este proyecto y fuera de las aulas de San Marcos, por permitirme aprender técnicas microanalíticas en la línea de investigación de enzimas que han contribuido en las conclusiones finales de esta tesis, por ello reitero mi gratitud en haberme enseñado nuevas perspectivas en la metodología de investigación de la Química.

Quedo agradecido al Dr. Mario Ceroni Galloso por aceptar cumplir el rol de asesor del período culminatorio de esta tesis y contribuir con sus opiniones en la redacción de este trabajo.

Agradezco al Laboratorio de Espectroscopía y Química Cuántica del Departamento de Fisicoquímica-UNMSM hoy bajo responsabilidad del Dr. Eduardo Montoya Rossi, por prestar el ambiente, aparatos y empleo de reactivos en la realización de la mayoría de los ensayos químicos.

Gracias al Dr. Julio Santiago Contreras y a su equipo de trabajo que laboran en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Química Orgánica del Departamento de Química Orgánica-UNMSM, por facilitarme el acceso a sus ambientes y uso de aparatos y reactivos durante el período final de esta tesis.

Extiendo mi agradecimiento a la empresa FRACTAL QUÍMICOS E.I.R.L., por brindarme acceso a sus instalaciones y empleo de aparatos en la ejecución de los ensayos químicos para la determinación de concentración de proteínas.

Finalmente doy las gracias a los miembros del desaparecido grupo de investigación "FIQUITA", por su amistad y momentos de debate científico. Así también, agradezco a mis compañeros de clase con quienes compartí vivencias estudiantiles y departé conversaciones de aventura juvenil.

ÍNDICE GENERAL

Lista de figuras

Lista de tablas

Resumen (Abstract)

Introducción

CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO **1**

1.1. EL ESTADO SÓLIDO, SEMISÓLIDO Y LÍQUIDO.....	1
1.1.1. Entropía en los sólidos, semisólidos y líquidos.....	2
1.1.2. Soluciones.....	3
1.2. QUITOSANO Y SU USO EN PROCESOS ENZIMÁTICOS.....	4
1.2.1. Técnicas de caracterización.....	6
1.2.2. Empleo del quitosano en catálisis enzimática.....	9
1.2.3. Esférulas de quitosano.....	10
1.3. TERMODINÁMICA ENZIMÁTICA.....	12
1.3.1. Entropía en catálisis enzimática.....	14
1.4. CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	16
1.5. CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS.....	18
1.5.1. Papaína.....	19
1.5.2. Caseína.....	23
1.6. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	24
1.7. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	29
1.7.1. Métodos de inmovilización.....	29
1.7.2. Clasificación de soportes.....	31

CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA DE TRABAJO **33**

2.1. PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL.....	33
2.2. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIALES.....	34
2.2.1. Reactivos.....	34
2.2.2. Aparatos.....	34
2.2.3. Materiales.....	34
2.3. PARTE EXPERIMENTAL.....	35
2.3.1. Caracterización y determinación de pureza de quitosano.....	35
2.3.1.1. Grado de desacetilación.....	35
2.3.1.2. Cuantificación de quitosano por viscosimetría capilar.....	36
2.3.2. Obtención de esférulas de quitosano.....	38
2.3.3. Actividad enzimática de papaína inmovilizada y en solución.....	38
2.3.4. Determinación de concentración de quitosano en esférulas.....	44

2.3.5. Determinación de concentración de papaína inmovilizada.....	45
--	----

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN **48**

3.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PAPAÍNA.....	48
3.2. CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO.....	51
3.2.1. Titulación potenciométrica.....	51
3.2.2. Determinación de concentración de quitosano.....	52
3.3. ESFÉRULAS DE QUITOSANO.....	54
3.3.1. Concentración de quitosano.....	55
3.3.2. Concentración de papaína inmovilizada.....	56

CONCLUSIONES **58**

RECOMENDACIONES **59**

BIBLIOGRAFÍA **60**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. La entropía y los estados de la materia.....	2
Figura 2. Estructura química del quitosano.....	5
Figura 3. Neutralización de HCl y el grupo amonio de DG-HCl por NaOH durante titulación.....	7
Figura 4. Entrecruzamiento e inmovilización enzimática por reticulación con glutaraldehído sobre la superficie de la esférula.....	12
Figura 5. Diagrama de coordenadas de reacción en la que se comparan reacciones catalizadas por enzima y sin catalizar.....	14
Figura 6. Dos formas donde una enzima puede disminuir la falta entrópica ($T\Delta S^\ddagger$).....	15
Figura 7. Estructura de papaína refinada a 1,65 Å de resolución.....	20
Figura 8. Estructura primaria de la cadena A de la papaína.....	21
Figura 9. Geometría del sitio activo de la cisteína proteasa que muestra el par de iones cisteína-histidina.....	22
Figura 10. Estructura de la κ -caseína.....	24
Figura 11. Reacción de formación del complejo púrpura entre el reactivo de Biuret y la proteína en medio alcalino.....	26
Figura 12. Formación del complejo proteína-CBB.....	27
Figura 13. Estructuras del azul de Coomassie G-250 y R-250.....	28
Figura 14. Plan general del desarrollo experimental.....	33
Figura 15. Equipo de titulación potenciométrica.....	36
Figura 16. Equipo de determinación de la viscosidad.....	37
Figura 17. Formación y filtración de esférulas.....	38
Figura 18. (a) Esférulas de quitosano con glutaraldehído. (b) Esférulas en Buffer pH 7,00 con papaína inmovilizada.....	39
Figura 19. Determinación de concentración de caseína no hidrolizada (actividad enzimática de papaína hidrolizada).....	41
Figura 20. Reacción de papaína inmovilizada sobre caseína.....	41
Figura 21. Determinación de concentración de caseína no hidrolizada (actividad enzimática de papaína en solución).....	42
Figura 22. Soluciones de caseína no hidrolizada.....	43
Figura 23. Soluciones de concentración estándar para curva de calibración.....	43
Figura 24. Determinación de concentración de quitosano en esférulas.....	44
Figura 25. Solución Bradford 2.....	45
Figura 26. Tratamiento de muestras de esférulas con enzimas.....	46
Figura 27. Determinación de concentración de papaína en esférulas de quitosano.....	47
Figura 28. Muestras y soluciones estándar (curva de calibración).....	47
Figura 29. Curva de calibración para determinación de concentración de proteínas no hidrolizadas.....	48
Figura 30. Gráficas comparativas de actividad enzimática de papaína.....	51
Figura 31. Curva de titulación y gráfica de la primera derivada.....	52

Figura 32. Influencia de la temperatura de equilibrio del sistema sobre la viscosidad relativa de soluciones de quitosano.....	53
Figura 33. Comportamiento de la viscosidad relativa respecto de la concentración a $T=20^{\circ}\text{C}$	53
Figura 34. Dependencia lineal de la viscosidad relativa frente a la concentración para soluciones diluidas de quitosano a 20°C	54
Figura 35. (a) Esférulas sin glutaraldehído. (b) Esférulas con glutaraldehído.....	55
Figura 36. Curva de calibración empleada en la determinación de concentración de quitosano.....	55
Figura 37. Curva de calibración para la determinación de concentración de papaína inmovilizada.....	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características estructurales de la papaína.....	20
Tabla 2. Características de leche bovina y algunas de sus propiedades.....	23
Tabla 3. Condiciones de preparación de soluciones de quitosano.....	37
Tabla 4. Condiciones experimentales empleadas para determinar la actividad enzimática de papaína inmovilizada.....	40
Tabla 5. Condiciones de preparación de la curva de calibración.....	40
Tabla 6. Condiciones experimentales utilizadas para determinar la actividad enzimática de papaína en solución.....	42
Tabla 7. Condiciones de preparación.....	44
Tabla 8. Clasificación de muestras de esférulas con papaína inmovilizada.....	45
Tabla 9. Curva de calibración para la determinación de concentración de papaína.....	46
Tabla 10. Absorbancias a 550 nm de soluciones de proteína no hidrolizada.....	48
Tabla 11. Concentración de proteínas no hidrolizadas.....	49
Tabla 12. Concentración de proteínas hidrolizadas.....	49
Tabla 13. Actividades enzimáticas de papaína inmovilizada y en solución.....	50
Tabla 14. Valores de concentración de quitosano obtenidos.....	56
Tabla 15. Datos de muestras y concentración de papaína.....	57

RESUMEN

Debido a que la entropía en el estado sólido es menor respecto de los semisólidos, y estos poseen menor entropía respecto de los sistemas líquidos o en solución es posible evaluar los efectos catalíticos sobre cada uno de estos sistemas.

La mayoría de los catalizadores se encuentran en estado sólido. En la actualidad para sistemas biotecnológicos se tienen catalizadores soportados en sistemas semisólidos. El objetivo de esta tesis ha sido estudiar comparativamente la actividad enzimática en soportes semisólidos de quitosano respecto de la actividad enzimática en sistemas en solución.

Para el cumplimiento del objetivo de este trabajo se ha desarrollado una metodología de preparación de esférulas de quitosano en las que se ha inmovilizado la enzima papaína. Además, se desarrolló un procedimiento propuesto en el artículo “*Determinación de la concentración de quitosano en polvo por viscosimetría capilar*” comprobándose la dependencia de la viscosidad relativa frente a la concentración. En la enzima inmovilizada se ha estudiado comparativamente respecto de la enzima en solución, las actividades enzimáticas. Colateralmente, se realizaron pruebas de medición de diámetro y concentración de quitosano en esférulas, además de la determinación de concentración de papaína inmovilizada.

Se ha determinado que la actividad enzimática de la papaína inmovilizada dio una actividad de 40 y 30 PU/mg respecto de la actividad enzimática en solución que dio 50 y 40 PU/mg.

De estos resultados se ha podido inferir que aun cuando las concentraciones de papaína inmovilizada son menores respecto de las concentraciones en solución, la actividad enzimática inmovilizada es menor en 10 PU/mg. La misma que puede atribuirse a que el factor entrópico y termodinámico juega un papel importante en los sistemas catalíticos inmovilizados en comparación con los sistemas en solución en donde el factor cinético juega un papel más preponderante. Finalmente y de manera complementaria se determinó que el proceso de inmovilización ocurrió en esférulas de quitosano de $2,268 \pm 0,0005$ mm de diámetro con 0,0645 mg/mL de concentración de quitosano, las cuales lograron inmovilizar entre 12 a 18,56 mg/kg (miligramos de papaína por kilogramo de quitosano).

De los resultados obtenidos en esta tesis, pueden desprenderse aplicaciones enzimológicas del sistema papaína-quitosano y análogas para otras enzimas y en general para procesos que involucren proteasas.

Palabras clave: Actividad enzimática, inmovilización enzimática, semisólidos, papaína, quitosano.

ABSTRACT

Because the entropy in the solid state is less in relation to the semi-solids, and they have lower entropy than in the liquid or solution systems, it is possible to evaluate the catalytic effects on each of these systems.

Most catalysts are in solid state, so currently for biotechnological systems there are catalysts supported in semi-solids systems. The objective of this research has been to study, comparatively, the enzymatic activity in semi-solid supports with respect to the enzymatic activity in systems in solution.

For the fulfillment the objective of this work, a methodology has been developed for the preparation of chitosan spherules in which the enzyme papain has been immobilized. In addition, a procedure proposed in the article "*Determination of the concentration of chitosan powder by capillary viscosimetry*" was developed, verifying the dependence of the relative viscosity against the concentration. In the immobilized enzyme, enzymatic activities have been studied comparatively with respect to the enzyme in solution. Collaterally, tests were performed to measure the diameter and concentration of chitosan in spherules, in addition to the determination of the concentration of immobilized papain.

It has been determined that the enzymatic activity of the immobilized papain gave an activity of 40 and 30 PU/mg with respect to the enzymatic activity in solution that gave 50 and 40 PU/mg.

From these results it has been possible to infer that even when the concentrations of immobilized papain are lower compared to the concentrations in solution, the immobilized enzymatic activity is lower in 10 PU/mg. The same can be attributed to the entropic and thermodynamic factor plays an important role in immobilized catalytic systems compared to systems in solution where the kinetic factor plays a more predominant role. Finally and in a complementary way, it was determined that the immobilization process occurred in chitosan spherules of $2,268 \pm 0,0005$ mm in diameter with 0,0645 mg/mL of chitosan concentration, which managed to immobilize between 12 to 18,56 mg/kg (milligrams of papain per kilogram of chitosan).

From the results obtained in this research, enzyme applications of the chitosan-papain system and analogous to other enzymes and in general to processes involving proteases can be derived.

Key words: Enzymatic activity, enzymatic immobilization, semi-solids, papain, chitosan.

INTRODUCCIÓN

La química del estado sólido involucra condiciones de orden energético que implica un potencial termodinámico intrínseco. Esta condición también se refleja en los catalizadores biológicos inclusive en los semisólidos. Los catalizadores biológicos que son considerados como la esencia de los mecanismos de los procesos metabólicos son al mismo tiempo los principios que sustentan la vida.

En este contexto, la inmovilización enzimática puede conducir a procesos selectivos de mayor rendimiento. Las leyes que sustentan este proceso y necesarias para su estudio son: Las leyes cinéticas relacionadas con la teoría de Michaelis-Menten y las leyes termodinámicas. Es por ello, que se plantea como hipótesis que bajo condiciones óptimas y en contexto de los modelos michaelianos la actividad enzimática de la papaína en soportes semisólidos debido a efectos entrópicos mejorará con respecto a los sistemas en solución.

Las aplicaciones de la actividad enzimática siempre han sido desarrolladas en su mayoría en sistemas en solución. En este trabajo se pretende una posible mejora de la actividad enzimática por inmovilización en un soporte semisólido de forma esferular. Los fundamentos de esta posible mejora se basan en criterios de la entropía del estado semisólido frente a la del estado líquido, la cual expone un mayor equilibrio energético. Bajo estos fundamentos se ha desarrollado un método sostenible para futuras investigaciones en los procesos de catálisis biológica vinculados con los criterios de que los sistemas con menor entropía conducen a procesos espontáneos y de mayor eficiencia como las reacciones enzimáticas.

En la actualidad, se han desarrollado estudios sobre inmovilización de enzimas incluyendo la papaína en soportes semisólidos conformados por polímeros naturales frente a sistemas en solución a través de métodos de determinación de concentración de proteínas de sustrato empleando la espectroscopía visible. Así mismo, se conocen también los fenómenos fisicoquímicos implicados en la interacción y atrapamiento de enzimas en dichos soportes poliméricos. Sin embargo, dichos estudios han ido dejando vacíos de conocimiento científico tales como bajo qué criterios relacionados a la termodinámica y cinética química pueden ser relevantes en este proceso. Resolver los puntos mencionados no solo permitirá contrastar la actividad enzimática de papaína en soportes de polímeros naturales frente a sistemas en solución, sino también conocer los factores dominantes sobre los procesos de inmovilización.

Ante este problema fue necesaria la utilización de técnicas microanalíticas para la medición de actividad enzimática bajo condiciones de temperatura y pH específicos sin desnaturalizar la estructura conformacional de la enzima. En ese sentido, se propone mejores alternativas de estudio cinético siguiendo el modelo de Michaelis-Menten. Se trata de técnicas de análisis como el uso de la espectroscopía visible a través del método de Biuret que es una técnica clásica de fácil acceso para la determinación de concentración de proteínas no hidrolizadas.

Así mismo, se empleó el método de Bradford, cuya técnica es de alta sensibilidad para cuantificación de trazas de proteína y que fue prescindible en la determinación y cuantificación de papaína inmovilizada.

Al querer lograr una alta sensibilidad de determinación proteica a nivel espectrométrico, conllevó a que se encuentre amplios resultados para el proceso en estudio por medio de soluciones a dilución infinita justificándose con la definición de solución ideal.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. EL ESTADO SÓLIDO, SEMISÓLIDO Y LÍQUIDO

Los **sólidos** poseen volumen y forma definida. Su estabilidad geométrica definida se relaciona con el hecho de poseer unidades estructurales, es decir, el movimiento libre de las moléculas están confinadas a posiciones definidas en equilibrio dentro del sólido, en cuyos alrededores las partículas pueden vibrar pero no abandonarlas fácilmente ¹.

Los sólidos no fluyen por aplicárseles una pequeña fuerza, sino que logran deformarse ligeramente, recobrando luego su forma original cuando deja de actuar dicha fuerza ².

Los sólidos pueden clasificarse en cristalinos y amorfos. Un **sólido cristalino**, por lo general, muestra un punto de fusión definido. Empleando la difracción de rayos X se permite demostrar que tiene una estructura regular y ordenada, constituyéndose de unidades idénticas que se repiten y tienen la misma orientación a través del cristal. Un **sólido amorfo** no tiene forma cristalina característica. Cuando se calienta, se ablanda y funde en un cierto intervalo térmico. Por difracción de rayos X muestra una estructura desordenada.

En el caso de los **polímeros**, normalmente, forman sólidos amorfos. Algunos forman sólidos cristalinos; otros como los polímeros sintéticos en estado sólido presentan la fase cristalina como la fase amorfa. El grado de cristalinidad de un polímero depende de su estructura y el proceso utilizado para la obtención del sólido ³. El enfriamiento polimérico permite la formación de un sólido amorfo. Mientras que la regularidad estructural de moléculas favorece la formación de cristales.

Posteriormente, el estado “**semi-sólido**” es definido como un electrolito “cuasi-sólido”. Se refiere en términos físicos a un sistema que se encuentra a lo largo de su estructura entre un sólido y un líquido. La particularidad de este estado está relacionada con las propiedades sólidas, como la capacidad de soporte de peso y mantener su forma. Sin embargo, el estado semisólido también comparte algunas propiedades de un líquido. Propiedades como la conductividad iónica y el contacto interfacial propias de los líquidos, también se encuentran en los electrolitos semisólidos. Algunos semisólidos son elásticos-duros y otros son muy blandos ⁵. Las características de un semisólido también se aplican en un gel de polímero electrolítico. Un gel polimérico es un sistema cuyas redes poliméricas se hinchan por acción de un solvente. Es por ello, que debido a una estructura híbrida, estos geles tienen tanto propiedades de cohesión de los sólidos como propiedades de difusión de los líquidos. Los electrolitos en gel, generalmente, resultan de incorporar una mayor cantidad de plastificante líquido y/o solvente en una matriz polimérica, obteniendo geles estables de polímero. Cuando se produce la gelificación, una solución polimérica diluida o más viscosa se convierte en un sistema de viscosidad infinita: un gel ⁵.

Finalmente, los **líquidos** son considerados como una continuación del estado gaseoso delimitados en regiones de volúmenes pequeños y atracciones moleculares muy grandes ¹.

Los líquidos tienen como propiedad que el volumen de ocupación es prácticamente el mismo que ocupa las moléculas que los conforman. Las fuerzas de cohesión de los líquidos son más fuertes comparadas a las de los gases inclusive a presiones muy elevadas, es por ello el mantenimiento de un volumen definido.

El movimiento molecular en los líquidos es aún caótico pero como ellos ocupan volúmenes muy menores, su distribución en el espacio es menos aleatoria ². Los líquidos tienen una compresibilidad muy baja, por no haber espacios libres entre las moléculas. Ellos fluyen bajo acción de una fuerza constante debido a que las moléculas tienen la libertad de moverse en cualquier dirección; sin embargo, existen otras moléculas que ofrecen resistencia al flujo (viscosidad). En conclusión la viscosidad en líquidos es mucho menor respecto de los sólidos.

1.1.1. Entropía en los sólidos, semisólidos y líquidos

La entropía es la medición termodinámica del orden y desorden energético de los componentes que conforman un sistema. La alta entropía se ve influenciada tanto por la amplia distribución de partículas como por una amplia distribución de cuantos energéticos. Cuanto mayor dispersión de partículas y energía haya, mayor entropía habrá (figura 1).

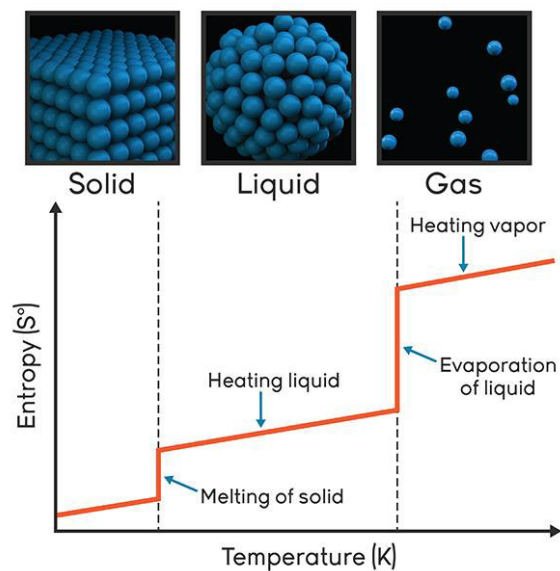


Figura 1. La entropía y los estados de agregación de la materia. La entropía aumenta a medida que aumenta la temperatura durante el cambio desde el estado sólido al estado líquido, y este al estado gaseoso ⁴.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, se deduce que una sustancia en el estado sólido tenga una entropía relativamente baja. En un sólido, las partículas están localizadas y altamente ordenadas, contrario al desorden entrópico ⁴. Los átomos apenas pueden desplazarse en una estructura rígida, por lo que sus oportunidades de expandirse son

mínimas. La energía en un sólido está restringida principalmente a la vibración, por lo que la distribución de los cuantos de energía también se ve minimizada.

En la transición de una fase ordenada hacia una fase desordenada ⁶ existe una ganancia de entropía ocasionada por el incremento de la temperatura; esta interpretación en el estado semisólido hace referencia que se presentan cambios de microestados sólidos a líquidos, y que su vez existe equilibrio de estos dentro del mencionado estado. Por tanto hay una coexistencia entre la energía vibracional y traslacional.

Finalmente, la entropía en los líquidos es mayor que los dos estados anteriores. Las partículas o átomos ya no están bloqueados en un lugar específico debido a que empieza a existir libertad de movimiento, por lo cual existe una mayor distribución. Los cuantos de energía también pueden vibrar, pero al haber movimiento poseen moléculas en equilibrio energético de movimientos de rotación y traslación ⁴.

1.1.2. Soluciones

Las soluciones son mezclas homogéneas de especies químicas dispersas a escala molecular². Según esta definición, las soluciones son una fase simple. Las soluciones pueden ser gaseosas, sólidas o líquidas. Estas pueden ser **binarias** (compuestas por dos constituyentes), **ternarias** (por tres), o **cuaternarias** (por cuatro). La especie constituyente presente en mayor cantidad se le conoce como **disolvente**, mientras que los constituyentes presentes en cantidades relativamente pequeñas se llaman **solutos**.

A partir de lo anterior se define como **solución ideal** a aquel sistema en la que la actividad (particularidad de los componentes al disolverse en el solvente) de cada constituyente es igual a la fracción molar bajo las mismas condiciones de presión y concentración ¹. Es decir, las actividades a_1 y a_2 correspondientes a las fracciones molares N_1 y N_2 , respectivamente, cumplen la ecuación (1.1.2.1.) para una solución binaria ideal.

$$\Delta G_m = n_1 RT \ln N_1 + n_2 RT \ln N_2 \quad (1.1.2.1.)$$

Donde ΔG_m es la energía libre total de la mezcla de dos componentes N_1 y N_2 .

Como el parámetro derecho de la ecuación (1.1.2.1.) es independiente de la presión, se puede aplicar la diferencial de ΔG_m respecto de la presión a temperatura constante, obteniéndose la ecuación (1.1.2.2.).

$$\left(\frac{\partial \Delta G_m}{\partial P} \right)_T = \Delta V = 0 \quad (1.1.2.2.)$$

De esta ecuación se entiende que en una solución binaria no hay cambio de volumen, por lo cual los volúmenes molares parciales de los componentes son idénticos respecto de los volúmenes molares de los componentes puros ^{1,2}.

Del mismo modo si dividimos ΔG_m entre T y aplicamos la diferencial de esta relación respecto de T a presión constante, se obtendrá la ecuación (1.1.2.3.).

$$\left[\frac{\partial \left(\frac{\Delta G_m}{T} \right)}{\partial T} \right]_P = - \frac{\Delta H_m}{T^2} = 0 \Rightarrow \Delta H_m = 0 \quad (1.1.2.3.)$$

Por consecuencia la formación de una solución ideal sucede sin el desprendimiento o absorción de calor ¹. Al ingresar esta última ecuación en la expresión $\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m$ se obtiene la ecuación (1.1.2.4.).

$$G = H - TS \rightarrow \Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m$$

$$\text{como } \Delta H_m = 0$$

$$\Delta G_m = -T\Delta S_m$$

$$\Delta S_m = -[n_1 R \ln N_1 + n_2 R \ln N_2] \quad (1.1.2.4.)$$

Se interpreta de la ecuación (1.1.2.4.) que para una solución ideal la variación entrópica de la mezcla, ΔS_m , es una función de la concentración y el número de componentes presentes ¹.

1.2. QUITOSANO Y SU USO EN PROCESOS ENZIMÁTICOS

El quitosano es un poliaminosacárido lineal que deriva de la N-desacetilación por tratamiento alcalino de la quitina. Esta N-desacetilación casi nunca se completa llegando en casos más óptimos en un índice entre 75 – 95%, cuya estructura química ^{7,8,9} se aprecia en la figura 2. La presencia de grupos aminos libres a lo largo de la cadena permite que esta macromolécula se disuelva en disolventes ácidos diluidos debido a la protonación ^{10,11} de estos grupos. La presencia de quitosano (polímero) en el agua (solvente) genera como resultado un aumento de la viscosidad inclusive a baja temperaturas. Este efecto depende de la concentración del polímero y la naturaleza del solvente. El agua permite que la macromolécula pueda hallarse desenrollada y alargada; es decir, es capaz de extender las cadenas lineales, así como desagregar ^{12,13,14} dichas cadenas.

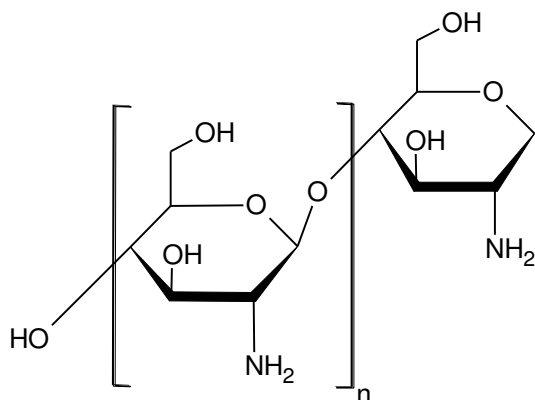


Figura 2. Estructura química del quitosano ⁷.

Ya que la intención es explorar las aplicaciones de este polímero a través de su participación en las reacciones de catálisis, primero se deben conocer las propiedades o características de este polímero a fin de conocer los aspectos que hacen del quitosano un material adecuado para los procesos químicos en mención. Estas propiedades son:

- **Estructura cristalina**

Debido al estudio de difracción de rayos X propuesto por George Clark y Albert Smith se determinó que la celda unidad de los cristales de quitosano pertenece al sistema cristalino ortorrómbico cuyas constantes cristalográficas son $a = 8,9$; $b = 10,25$ y $c = 17,0$ Å (o al sistema monoclinico con $\beta = 88^\circ$ como una posible alternativa). Las cadenas y anillos se encuentran en 200 planos ¹⁵.

Tanto el grado de cristalinidad y la estructura molecular son factores en la explicación de las propiedades funcionales del quitosano tales como solubilidad, tensión mecánica entre otras.

- **Solubilidad**

El quitosano al ser una base, forma sales con ácidos forman polielectrolitos cuyas solubilidades están en función de la naturaleza del anión, del grado de desacetilación, del peso molecular promedio del polímero, de la temperatura y del número de grupos amino libres en la molécula. Este polisacárido es soluble en diferentes solventes.

❖ **Ácidos inorgánicos:** El quitosano es soluble en ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido nítrico y ácido perclórico diluidos ¹⁶. Es insoluble en ácido sulfúrico diluido y mejora la solubilidad incrementando la concentración del ácido aunque, el proceso va acompañado de sulfonación y degradación del tamaño de cadena.

❖ **Ácidos orgánicos:** Forma sales solubles con ácidos orgánicos diluidos. Estos son: Ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, y otros disolventes

como ácido láctico, ácido ascórbico, ácido pirúvico. Sin embargo, es insoluble en ácido benzoico, ácido cinámico y ácido oxálico.

- ❖ **Solventes orgánicos:** Es soluble en tetrahidrofurano, acetato de etilo y 1,2-dicloroetano.

1.2.1. Técnicas de caracterización

Las características estructurales del quitosano condicionan sus propiedades, como también sus aplicaciones. Es por ello que las distintas estructuras de quitosano se emplean hacia una misma aplicación, esto se debe a que el quitosano es cristalino y presenta polimorfismo ⁸.

La caracterización del quitosano refiere a describir el material de partida, el grado de desacetilación, peso molecular promedio y sus propiedades en solución. Por su estructura, el quitosano se caracteriza mediante la determinación del grado de desacetilación y el peso molecular. Estos son los principales aspectos a caracterizar:

- **Determinación del grado de desacetilación**

El **grado de desacetilación** (degree of deacetylation, DD) del quitosano es el parámetro que indica el porcentaje molar de unidades monoméricas de glucosamina que varía desde 0 (quitina) hasta 100 (quitina totalmente desacetilada). Es un parámetro importante, ya que influye en las propiedades mecánicas, fisicoquímicas y biológicas del quitosano y sus derivados.

En general, aquel quitosano con grado de desacetilación más alto posee mejores propiedades que el quitosano mal desacetilado, esto debido a la mayor concentración de grupos $-NH_2$ frente a restos de N-acetilglucosamina. Por lo tanto, determinar este parámetro es esencial en la predicción y validación de propiedades para explicaciones específicas ¹⁷.

Se han empezado a utilizar técnicas para determinar el grado de desacetilación del quitosano tales como la espectroscopía por resonancia magnética nuclear de protones (1H -RMN, ^{13}C -RMN en estado sólido, y ^{15}N -RMN), la espectrofotometría UV, la valoración potenciométrica y conductimétrica, calorimetría diferencial de barrido o análisis elemental CHN, entre otros ¹⁷. De las técnicas de caracterización en mención las más accesibles para el trabajo en laboratorio son por potenciometría y conductometría.

En el caso de la **valoración potenciométrica**, el quitosano (~ 0,05 g) de una concentración conocida se disuelve en un exceso de solución ácida diluida (solución de HCl 0,1 mol.L⁻¹, o ácido acético 1%). Esta solución es titulada con una solución alcalina diluida (NaOH 0,1 mol.L⁻¹) midiendo el pH empleando el potenciómetro ¹⁷ durante el ensayo. La variación de pH para la solución de quitosano está en función del volumen de solución alcalina agregado, por ello la curva de titulación presenta dos puntos de inflexión. La diferencia entre los volúmenes de solución básica correspondientes a los

puntos de equivalencia ¹⁸ es igual a la cantidad de solución alcalina añadida para la conversión de grupos amino en sales de amonio, queda descrita en la ecuación (1.2.1.1.).

$$DD = \frac{16,1(y-x)}{w} f \quad (1.2.1.1.)$$

Donde y es el punto de mayor inflexión, x es el punto de menor inflexión, ambos están expresados en unidades de volumen (mL), f es la concentración normal estandarizada de la solución de NaOH, w es la masa en gramos de muestra y 16,1 es un factor asociado al peso molecular del grupo $-NH_2$.

Finalmente para el ensayo de **valoración conductimétrica**, se disuelve una muestra de quitosano seca en solución ácida bajo agitación magnética constante. Luego se añade como titulante una solución diluida de NaOH en intervalos de volumen de 0,5 mL por intervalos de tiempo de 20 s. Los valores de conductividad ($mS.cm^{-1}$) frente a sus correspondientes volúmenes de titulación se distribuyen en una gráfica para encontrar la variación lineal antes y después del punto de equivalencia. La intercepción de las pendientes de la gráfica forman un ángulo agudo y proyección en el eje de abscisas, esto permite determinar el volumen correspondiente al punto de equivalencia ^{3, 17, 19}.

La valoración potenciométrica como la conductimétrica quedan en evidencia bajo una relación de neutralización entre la solución de glucosamina (DG)-HCl e hidróxido de sodio, cuya representación se observa en la figura 3.

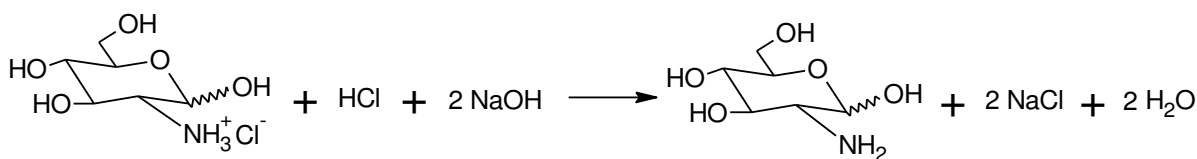


Figura 3. Neutralización de HCl y el grupo amonio de DG-HCl por NaOH durante titulación ¹⁹.

- **Determinación del peso molecular**

Los polímeros se caracterizan de ser moléculas de cadena, cuya longitud varía en función a una distribución estadística (polidispersión), por lo que se define el peso molecular, el cual depende de la muestra y del método empleado para la determinación. Una de estas técnicas utilizadas para determinar el peso molecular promedio del quitosano y otros polímeros es por la determinación de la viscosidad.

La viscosidad (η) es la propiedad que caracteriza la resistencia que ofrece un fluido al flujo ³. En las mediciones, la viscosidad de flujo de un fluido en tubo capilar depende de las dimensiones de éste (radio y longitud), de la velocidad del fluido y de la diferencia de presión entre los extremos del capilar. Para hallar la relación de estas magnitudes, se mide el flujo que pasa por cualquier punto del tubo capilar por unidad de tiempo. Finalmente,

esta relación se demuestra en la fórmula de Poiseuille^{2, 20} expresada en la ecuación (1.2.1.2.).

$$v = \frac{\pi P r^4}{8 \eta l} \quad (1.2.1.2.)$$

Donde v es la velocidad de flujo; P , presión que ejerce el fluido dentro del capilar; r , radio transversal interno del capilar; η , la viscosidad del fluido y l , longitud del capilar. Despejando la ecuación de Poiseuille se tiene la ecuación (1.2.1.3.).

$$\eta = \frac{\pi P r^4}{v} \quad (1.2.1.3.)$$

Si se sustituye la velocidad de flujo por la relación de volumen contenido entre los aforos, V y el tiempo de flujo, t , se obtiene una expresión que elimina las constantes numéricas, así como los parámetros r , l y V . Al considerar la presión, P como el producto de la altura, h del capilar; la densidad de flujo, ρ y la fuerza de gravedad, g , debido a ser constantes la altura del capilar y la fuerza de gravedad. Para soluciones diluidas no se presentan diferencias significativas de la densidad respecto del solvente, por lo que se determina la viscosidad relativa.

La viscosidad relativa (η_r) es la relación lineal entre la viscosidad de la solución y la viscosidad del solvente²⁰. Ambas viscosidades se miden en un viscosímetro capilar de precisión. La viscosidad relativa se define con la ecuación (1.2.1.4.).

$$\eta_r = \frac{\eta_{\text{solución}}}{\eta_{\text{solvente}}} = \frac{h \rho_{\text{solución}} g t_{\text{solución}}}{h \rho_{\text{solvente}} g t_{\text{solución}}} = \frac{t_{\text{solución}}}{t_{\text{solvente}}} \quad (1.2.1.4.)$$

La viscosidad relativa se determina midiendo los tiempos de flujo del solvente y de las soluciones diluidas. La viscosidad relativa representa una dependencia frente a la concentración según la ecuación (1.2.1.5.).

$$\eta_r = \frac{\eta_{\text{solución}}}{\eta_{\text{solvente}}} = 1 + [\eta]C + KC^2 \quad (1.2.1.5.)$$

Donde $[\eta]$ y K son constantes. Para $C = 0$, $\eta_r = 1$ ya que $\eta_{\text{solución}} = \eta_{\text{solvente}}$; para bajas concentraciones (soluciones diluidas) se presenta una dependencia lineal mientras que para mayores concentraciones la dependencia es parabólica. La unidad física de viscosidad es el pascal por segundo (Pa.s) según el Sistema Internacional (S.I.), también se emplea como unidad el poise (1P = 1g/cm.s = 0,1 Pa.s), pero para fines de cálculo se emplea el submúltiplo centipoise (1cP = 10⁻³ Pa.s) debido a que el agua tiene una viscosidad de 1,002 cP a 20°C.

Así mismo, los tiempos de flujo de la solución y del solvente se utilizan para calcular la viscosidad específica (η_{sp}), la viscosidad reducida (η_{red}). La intercepción gráfica de la viscosidad reducida frente a la concentración determina la viscosidad intrínseca^{20, 21} ($[\eta]$) representada en la ecuación (1.2.1.6.).

$$\text{viscosidad específica: } \eta_{sp} = \frac{t_{solución}}{t_{solvente}} - 1$$

$$\text{viscosidad reducida: } \eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C}$$

$$\text{viscosidad intrínseca: } [\eta] = \lim_{C \rightarrow 0}(\eta_{red}) \quad (1.2.1.6.)$$

La viscosidad intrínseca de una solución polimérica está relacionada con el peso molecular del polímero según la ecuación de Mark-Houwink

$$[\eta] = KM^\alpha$$

Donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca; M , la masa molar promedio del polímero, y K y α son constantes que varían según el grado de desacetilación del quitosano. Se determina los valores de las constantes K y α , graficando $\log_{10}[\eta]$ en función de $\log_{10}M$ para un sistema soluto-solvente dado, empleando mediciones de fracciones conocidas de M . Conocidos los valores K y α se puede determinar con facilidad la masa molar de cualquier muestra de polímero a partir del valor medido de la viscosidad intrínseca. La unidad empleada para C en estas ecuaciones es g/dL.

1.2.2. Empleo de quitosano en catálisis enzimática

Es así, que a partir de detallar las propiedades y formas de caracterización del quitosano se puede realizar el estudio de aplicación de este material. Una de estas aplicaciones es el uso del polímero dentro de los procesos catalíticos. El quitosano es un material que se puede manipular fácilmente bajo la forma de perlas, películas o fibras, esto es lo que permite tener una gran flexibilidad en su manipulación, además de ser un potencial soporte catalizador²².

El quitosano presenta estructuras estables; esta condición es considerada cuando este polímero es tomado como catalizador. Es de probabilidad que se produzcan degradaciones si el quitosano se encuentra en condiciones ácidas y que sea proclive a ataques oxidativos. También es poco probable que ocurra una reducción del peso molecular, ya que dicho peso inicial es muy alto². Sin embargo, el quitosano puede ser degradado por oxidantes, por ejemplo según estudios de Feng Tian²³ se demostró que el peróxido de hidrógeno a concentraciones de 0,5 a 2M podría despolimerizar el quitosano; las regiones amorfas sufren el ataque de manera aleatoria, por lo que el oxidante puede introducirse fácilmente en la estructura. De esta manera el quitosano amorfo despolimeriza más rápido que la fase cristalina.

Bajo los aspectos anteriores se busca que las reacciones catalizadas por enzimas sean reacciones eficientes y selectivas, trabajadas a temperatura ambiente en medios acuosos y cerca de un pH neutro; es por ello que resulta adecuado emplear soportes poliméricos de origen natural. Debido a la dificultad de controlar las condiciones de desarrollo de las reacciones enzimáticas es de considerar la inmovilización como uno de los métodos adecuados en la estabilización de las enzimas, además de poder facilitar la eliminación de la mezcla de reacción para la reutilización. El quitosano es el material adecuado por poseer una serie de ventajas para la inmovilización de enzimas:

1. El quitosano se disuelve en soluciones diluidas de ácido orgánico y se precipita fácilmente.
2. Las enzimas pueden unirse químicamente al quitosano a través de los grupos reactivos (-OH y -NH₂).
3. El quitosano no es tóxico.
4. Tiene una alta afinidad proteica.

Es posible inmovilizar una enzima dentro del quitosano a través del atrapamiento físico que consiste en poner en contacto el quitosano con una solución enzimática sin que exista formación de enlaces; mientras que a través de procesos como la unión covalente o la reticulación existe formación de enlaces tipo covalente entre la enzima y el soporte.

1.2.3. Esférulas de quitosano

Al inmovilizar las enzimas covalentemente en quitosano a través de grupos reactivos unidos con los grupos funcionales -NH₂ o -OH en la unidad glucosamina están acompañados de otros grupos funcionales provenientes del glutaraldehído, dando como resultado una reticulación. Es por ello, que para dar efectividad en el atrapamiento e inmovilización de la enzima por reticulación el soporte sugiere tener la forma de una perla²².

Las perlas, microesferas o por el criterio de la presente tesis denominadas *esférulas* (cuyo volumen es parecido al volumen de una esfera) son estructuras constituidas por una red compacta de material polimérico, en el cual la sustancia a atrapar se encuentra en estado de solución. Estas estructuras son homogéneas, por tanto son sistemas matriciales.

Las esférulas de quitosano son preparadas a partir de una solución de quitosano en ácido acético entre 2 a 5% v/v, el cual al aspirar una fracción de volumen es precipitada por goteo a una distancia entre 2 a 3 cm de altura respecto de la superficie de una solución de hidróxido de sodio de concentración entre 1,5 a 2M (agente coagulante). Este proceso de formación se le conoce como el método de inversión de fase^{24, 25}. Luego de este proceso las esférulas se tornan blanquecinas y su diámetro se encuentra en el rango de 1,5 a 2 mm. Finalmente para el proceso de entrecruzamiento las esférulas se someten a un baño de glutaraldehído entre 2 a 3% v/v incrementando el diámetro de estas esférulas tornándolas amarillentas.

Bajo esta forma de soporte según el estudio dirigido por Koki Itoyama ²⁶ al lograr inmovilizar la papaína en perlas de quitosano sin entrecruzamiento, midió el diámetro de poro de estas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) resultando un valor de 300µm ²⁶. Parte del detalle de caracterización de las esférulas influyó en el desarrollo del proceso de inmovilización dando como conclusión que la papaína inmovilizada en una superficie de soporte de quitosano con cualquier longitud de espaciador o poro de fijación covalente muestra una actividad alta respecto de la inmovilización de papaína en una superficie de soporte sin espaciador; sin embargo esto ocurrió empleando de sustrato la caseína. Por otro lado, la papaína inmovilizada en soporte poroso dio una actividad casi constante para la hidrólisis de sustrato. También parámetros como el pH, la estabilidad térmica y la estabilidad de almacenamiento fueron superiores frente a los valores de la papaína en solución. Finalmente la actividad enzimática inicial de la papaína inmovilizada se mantuvo, casi sin ninguna eliminación e inactivación de papaína, lo que evidencia durabilidad de la papaína unida al soporte.

En el caso del estudio Mohammad H. Mahaninia concluye que para el atrapamiento por reticulación de la roxarsona ²⁴ (ROX; ácido 4-hidroxi-3-nitrobenzoico) su adsorción dentro de perlas de quitosano depende de la modificación y la disposición del entrecruzamiento debido a la utilización del glutaraldehído o la epíclorhidrina (figura 4).

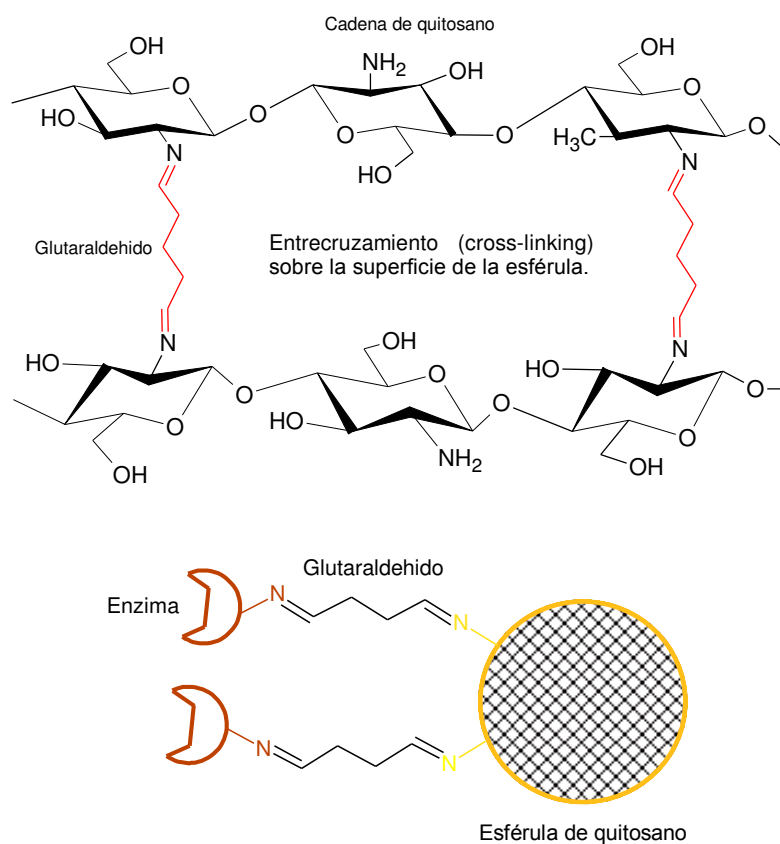


Figura 4. Entrecruzamiento e inmovilización enzimática por reticulación con glutaraldehído sobre la superficie de la esférula de quitosano ^{24, 25}.

1.3. TERMODINÁMICA ENZIMÁTICA

Las observaciones cuantitativas realizadas por físicos y químicos sobre la interconversión de las diferentes formas de energía condujeron hacia la formulación, en el siglo XIX, de dos leyes fundamentales de la termodinámica. La primera ley refiere al principio de conservación de la energía, es decir, para cambios físicos y químicos, la cantidad total de energía permanece constante. La segunda ley de la termodinámica enuncia que todos los sistemas frente a sus alrededores tienden hacia la mayor entropía.

Los sistemas biológicos consisten en estructuras moleculares mucho más organizadas que los materiales circundantes a partir de las cuales están construidas, y mantienen un orden aparentemente inconsciente frente a la segunda ley. Sin embargo, estos sistemas no violan la segunda ley sino que operan estrictamente dentro de ella. El sistema de reacción es la porción delimitada de materia que experimenta un proceso químico o físico determinado; puede ser un organismo, una célula o dos compuestos químicos que reaccionan. Dicho sistema y sus alrededores constituyen el universo. En laboratorio, algunos procesos químicos o físicos pueden llevarse a cabo en sistemas aislados o cerrados, en los que no existe intercambio de masa ni energía con el entorno. Sin embargo, tanto las células como organismos vivos son sistemas abiertos que intercambian tanto masa como energía con sus alrededores.

La termodinámica bioquímica se basa en la termodinámica química de soluciones acuosas, pero es muy diferente porque el pH es empleado como variable independiente. La termodinámica de reacciones químicas en solución acuosa se basa principalmente en la energía libre de Gibbs, G , que proporciona el criterio de espontaneidad química de una reacción a una temperatura y presión específica, $(dG)_{T,P} < 0$. La ecuación fundamental de la energía libre de Gibbs, dG , y que deriva de la ecuación de unión de la primera y segunda ley de la termodinámica²⁷ es la ecuación (1.3.1.).

$$TdS = dU + PdV + \sum_{j=1}^N \mu_j dn_j$$

$$dU + PdV - TdS = 0$$

$$dU + PdV + VdP - TdS - SdT = -SdT + VdP$$

$$d(U + PV - TS) = -SdT + VdP$$

$$dG = -SdT + VdP + \sum_{j=1}^N \mu_j dn_j \quad (1.3.1.)$$

Donde S es la entropía del sistema, V es el volumen del sistema, dT y dP , son las diferenciales de temperatura y presión, respectivamente, N representa el número de componentes diferentes del sistema, μ_j es el potencial químico de cada componente del

sistema, y n_j es la cantidad de componentes j del sistema. Los potenciales químicos de los componentes pueden ser remplazados con energías de Gibbs de formación, ΔG_j , descrito en la ecuación (1.3.2.).

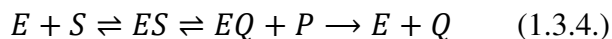
$$dG = -SdT + VdP + \sum_{j=1}^N \Delta G_j dn_j \quad (1.3.2.)$$

Las reacciones químicas en soluciones acuosas equilibran átomos y cargas eléctricas. Los fisicoquímicos expresan las constantes de equilibrio K en términos de las actividades de las especies químicas que reaccionan. Para reacciones químicas en soluciones acuosas a dilución infinita, la ecuación extendida de Debye-Hückel se puede emplear para calcular las energías de Gibbs de formación de especies j y concentración c_j , según la ecuación (1.3.3.).

$$\Delta G_j = \Delta G_j^o + RT \ln \gamma_j c_j = \Delta G_j^o + RT \ln \gamma_j + RT \ln c_j \quad (1.3.3.)$$

Donde ΔG_j^o es la energía libre de Gibbs estándar de formación del ión j con fuerza iónica cero y γ_j es el coeficiente de actividad del ión j .

El mecanismo de una reacción enzimática es descrito como una serie de pasos que se conducen desde la acción enzimática sobre el sustrato hacia la formación de productos, y que muestran la ocurrencia de especies intermedias. La existencia de un intermedio como el complejo enzima-sustrato, ES , no es evidente a partir de la ecuación estequiométrica balanceada para la reacción, debido a ello, para enzimas hidrolíticas se propuso un mecanismo más complejo que divide el sustrato en dos productos²⁸, quedando expresado en la ecuación (1.3.4.).



Aquí EQ es un complejo intermedio enzima-producto, y P y Q son los productos.

Otra especie intermedia que se puede agregar al mecanismo de reacción enzimática es ES^\ddagger , que representa un *complejo activo* o *complejo de estado de transición*. Este complejo es de estructura intermedia entre los complejos enzima sustrato y enzima producto, por lo que la idea de una transición gradual de sustrato a productos se hace explícita al incluir esta especie.

El diagrama de estado de transición de la figura 5 muestra los niveles de energía relativos de las especies involucradas en un mecanismo enzimático hipotético. El diagrama muestra que para formar la especie ES^\ddagger , se debe obtener una cierta cantidad de energía, ΔG^\ddagger , ganado por ES . Esta energía, llamada **energía de activación**, es una medida de la facilidad de formación del estado de transición. Cuanto más alto sea el valor de ΔG^\ddagger , mayor será la barrera de energía del estado de transición que debe superarse para formar el producto. Cuanta más alta sea la barrera, menor será el número de especies de ES que podrán adquirir la cantidad de energía necesaria en un período de tiempo determinado, esto genera un avance lento de la reacción.

Un punto importante sobre la catálisis, en general, es que el catalizador proporciona una nueva vía de reacción o mecanismo que es distinta de la vía no catalizada. El nuevo mecanismo se caracteriza por una menor energía de activación, ΔG_{cat} , frente a la ruta no catalizada, ΔG_{uncat} . Uno de los principales objetivos del estudio sobre reacciones enzimáticas es determinar cómo la enzima puede disminuir la cantidad de ΔG^\ddagger lo suficiente para generar mejoras en la velocidad de reacción ²⁸.

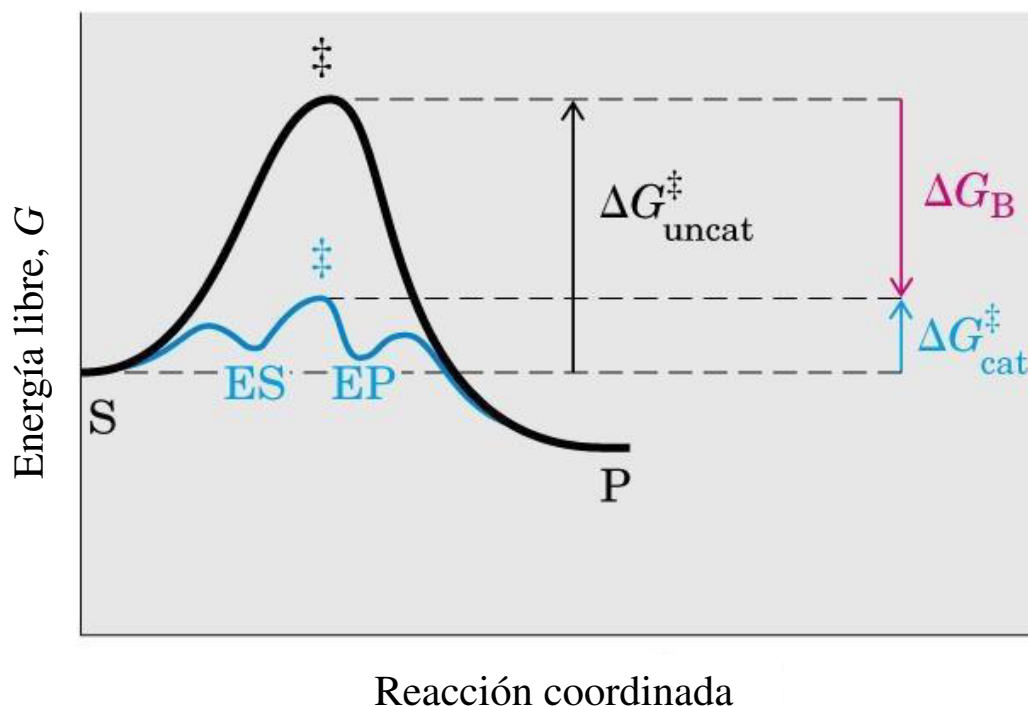


Figura 5. Diagrama de coordenadas de reacción en la que se comparan reacciones catalizadas por enzima y sin catalizar ^{28, 29}. Fuente: Nelson D. et al., 2007.

1.3.1. Entropía en catálisis enzimática

Las reacciones químicas sin catalizadores en solución se relacionan, a menudo, con entropías de activación negativas, lo cual agrega una penalidad considerable ($-T\Delta S^\ddagger$) a la energía libre de activación general ($\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$). Esta falta entrópica se interpreta como una pérdida de movimientos de traslación y rotación de los reactantes a medida que pasan su estado de transición (TS), es decir, cuando los reactantes se encuentran en un estado estándar de 1M, existe una pérdida de entropía traslacional relacionada con su proximidad en el estado de transición. Del mismo modo, en el estado reactivo, las moléculas reaccionantes giran libremente mientras que el estado de transición puede implicar condiciones específicas para un cruce efectivo en la barrera, así esto implica una pérdida de la entropía rotacional ³⁰.

Por tanto, las reacciones bimoleculares se consideran asociadas con entropías de activación negativas respecto de las reacciones unimoleculares sin tener en cuenta los posibles aportes de los disolventes. Sin embargo, la contribución de la entropía del disolvente, también se puede tomar en cuenta para procesos que involucren transferencia de carga, donde puede dominar el cambio de entropía.

Al unirse de manera perfecta las enzimas con sus sustratos, es razonable que no exista faltas entrópicas de traslación y rotación. Este enunciado se relaciona con la hipótesis del estudio de William P. Jencks ³¹ que plantea que la enzima gasta parte de la energía de unión libre en desestabilizar los sustratos.

A pesar de que esta desestabilización puede implicar factores de entalpía (ejemplo, desolvatación, tensión electrostática o conformacional), la interpretación conlleva a la entropía del sustrato, es decir, las faltas por entropía se han compensado, por lo que la barrera de activación podría escalarse sin ninguna pérdida entrópica (figura 6), lo que producirá una aceleración importante de la velocidad de reacción de la enzima.

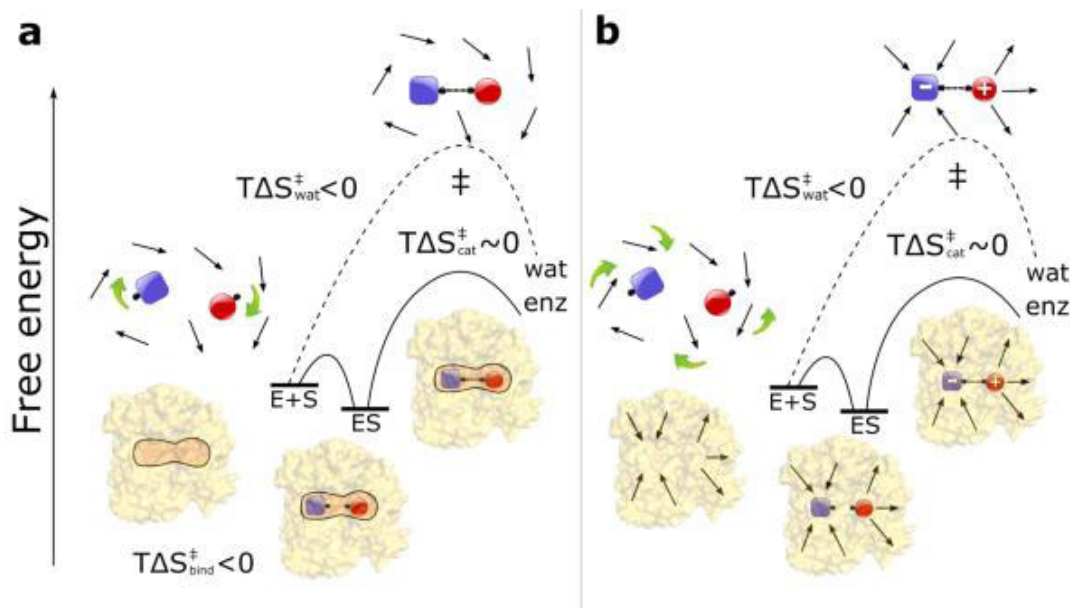


Figura 6. Dos formas donde una enzima puede disminuir la falta entrópica ($T\Delta S^\ddagger$). **(a)** Si la pérdida de entropía en el agua está dominada por el ordenamiento de los reactantes, por tanto la enzima compensa esta pérdida al unirse al sustrato y la catálisis continúa sin pérdidas entrópicas. **(b)** Si $T\Delta S^\ddagger$ en el agua está dominado por reorganización del disolvente, la enzima elimina la falta por pre-organización del sitio activo. La entropía de enlace no necesita estar correlacionada con la entropía de activación ³⁰. Fuente: Åqvist J. et al., 2017.

Al ser evidente una pérdida de entropía de traslación y de rotación que se involucra con la unión con el sustrato, el aspecto discutible es la magnitud de aporte catalítico y si éste se ve opacado por otros factores. Jencks planteó que la contribución dominante es reducir la barrera de activación (hasta 11 kcal/mol). También su aporte fue que el cambio de entropía

intrínseca de reactantes no se separa experimentalmente de las contribuciones del medio que los rodea, sino que toma en consideración los efectos de energía libre de activación de este último gozan de menor importancia y están sujetos a compensación de entalpía-entropía³⁰.

Según el trabajo de Richard Wolfenden³² demostró que las enzimas reducen el ΔH^\ddagger envés de la falta $-T\Delta S^\ddagger$. Incluso Thomas C. Bruise³³ llegó a concluir que la entalpía y no la entropía es el factor impulsor de la alta fracción de conformaciones de ataque en las enzimas, aunque este aumento de conformaciones refleja la estabilización del TS .

Desde el enfoque del análisis computacional examina que las contribuciones de energía libre debido a la restricción de los reactantes sobre las enzimas y la solución llega a concluir que el efecto es más pequeño de lo previsto, ya que los movimientos producidos por los reactantes como por los estados de transición se suprimen por la enzima. Por lo tanto, la supuesta pérdida completa de la entropía tanto de traslación como de rotación sin cambios adicionales hacia el TS es simplificado en exceso. Sin embargo, para establecer comparaciones es necesario calcular las entropías de activación tanto de las enzimas como de estas dentro de la solución, además de incluir las contribuciones del solvente y la proteína³⁰.

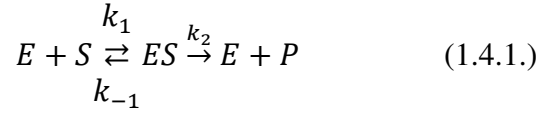
En conclusión, si bien los efectos entrópicos desempeñan un papel importante en la catálisis enzimática, su interpretación no es directa. Esta particularidad, expone que existe un mal enfoque de estudio sobre las entropías de traslación y rotación, además de la conformación del sustrato en el proceso catalítico; es decir, para entender el origen de contribuciones entrópicas al aumentar la tasa enzimática, es necesario tomar en consideración las entropías de activación medidas, lo que incluye no solo estudiar al sustrato y su entorno respecto del sitio activo, sino también el resto de proteína y el solvente que la rodea.

Con métodos eficientes hacia el análisis computacional y la predicción de parámetros de activación termodinámica de reacciones enzimáticas, una comprensión profunda del factor entrópico de manera completa está al alcance y será de gran utilidad para racionalizar los experimentos enzimológicos como para la ingeniería y diseño de estructuras enzimáticas.

1.4. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Las enzimas son moléculas proteicas que catalizan la mayoría de reacciones químicas que ocurren en los organismos vivos. Una de las características de la catálisis enzimática es la especificidad de la enzima en una reacción particular. Las enzimas hacen aumentar considerablemente las velocidades de reacción, esto conlleva a que dichas velocidades se consideren despreciables para reacciones bioquímicas. La molécula sobre la que actúa una enzima se denomina **sustrato**, enlazándose a un *centro activo* de la enzima formando un **complejo enzima-sustrato**; al permanecer enlazado a la enzima, el sustrato se transforma en producto, evento en el cual se libera la enzima^{2,3}.

El mecanismo enzimático basa su comportamiento según el modelo de **Michaelis-Menten**, descrito en la ecuación (1.4.1.).



Donde E es la enzima libre, S el sustrato, ES el complejo enzima-sustrato y P es el producto. La reacción global es $S \rightarrow P$. La enzima se consume en la primera etapa y se regenera en la segunda etapa.

En la mayoría de estudios experimentales sobre cinética enzimática, la concentración de la enzima es mucho menor que la concentración del sustrato: $[E] \ll [S]$. Por lo tanto, la concentración del complejo enzima-sustrato es mucho más pequeña que la del sustrato, y puede aplicarse la aproximación del estado estacionario para ES según se describe en la ecuación³⁴ (1.4.2.).

$$\begin{aligned} \frac{d[ES]}{dt} &= k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \\ &= k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0 \end{aligned} \quad (1.4.2.)$$

Si $[E]_0$ es la concentración inicial de enzima, entonces $[E]_0 = [E] + [ES]$. Puesto que la concentración de enzima $[E]$ durante la reacción química generalmente se desconoce, mientras que $[E]_0$ sí se conoce, se sustituye $[E]$ por $[E]_0 - [ES]$. A través de las expresiones cinéticas se obtiene la ecuación (1.4.3.).

$$\begin{aligned} \frac{d[E]}{dt} &= (k_{-1} + k_2)[ES] - k_1[E][S] ; \quad \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \\ \frac{d[S]}{dt} &= k_{-1}[ES] - k_1[E][S] ; \quad \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \end{aligned}$$

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} \quad (1.4.3.)$$

Reduciendo esta ecuación, puesto que la concentración del complejo intermedio es muy pequeña, se expresa que $-d[S]/dt = d[P]/dt$. Además, la reacción se sigue únicamente en el comienzo, determinando así la velocidad inicial v_0 . Expresando $[P]$ igual a 0 y $[S]$ igual a $[S]_0$, resulta la ecuación (1.4.4.).

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} ; \quad \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m$$

$$v_{Rx} = v_0 = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_2[ES]$$

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (1.4.4.)$$

En este contexto la constante compuesta K_m se conoce como **constante de Michaelis** y la ecuación de velocidad (1.4.4.) se denomina **ecuación de Michaelis-Menten**. Observando que conforme $[S]_0$ se vuelve muy grande, la velocidad alcanza el valor límite, $v_{m\acute{a}x}$; lo que conlleva a hallar la ecuación (1.4.5.).

$$v_{m\acute{a}x} = k_2[E]_0$$

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x}[S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (1.4.5.)$$

Invirtiendo ambos lados de esta ecuación, se tiene la ecuación cinética (1.4.6.).

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{m\acute{a}x}} + \left(\frac{K_m}{v_{m\acute{a}x}} \right) \frac{1}{[S]_0} \quad (1.4.6.)$$

La expresión cinética (1.2.6.) es la **ecuación de Lineweaver-Burk**; esta ecuación se comporta linealmente con la gráfica de $1/v_0$ en función de $1/[S]_0$, esta recta tiene ordenada en el origen igual a $1/v_{m\acute{a}x}$ y pendiente igual a $K_m/v_{m\acute{a}x}$.

1.5. CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS

En 1956, la IUBMB (International Union of Biochemistry) brindó recomendaciones sobre la denominación y clasificación de enzimas. Esto consiste en nombrar e identificar la enzima sistemáticamente con un número EC; este código es una descripción de cuatro niveles que se utiliza para clasificar las enzimas en función de la transformación química general de los sustratos en productos. El primer nivel corresponde a seis clases diferentes según el tipo de reacción química que se efectúe, estas son:

EC 1 *Oxidoreductasas*, que catalizan reacciones en las que el sustrato dona uno o más electrones a un aceptor de electrones, oxidándose en el proceso.

EC 2 *Transferasas*, catalizan las reacciones en las que un grupo químico se transfiere de un sustrato donante hacia un sustrato aceptor.

EC 3 *Hidrolasas*, catalizan reacciones en las que un enlace en un sustrato se hidroliza para producir dos fragmentos.

EC 4 *Liasas*, catalizan reacciones no hidrolíticas en las que se elimina un grupo químico de un sustrato que deja un enlace.

EC 5 *Isomerasas*, catalizan reacciones de un producto de un solo sustrato que pueden considerarse como reacciones de isomerización.

EC 6 *Ligasas*, que permiten catalizar la unión de dos o más moléculas acopladas a la hidrólisis de ATP o una molécula análoga. Estas enzimas también se denominan **sintetasas**, un nombre que ya estaba en uso antes de la creación de la Comisión de Enzimas (EC).

Estas clases EC se dividen en subclases y sub-subclases (segundo y tercer nivel, respectivamente) de acuerdo con una variedad de criterios, como el enlace químico formado, el centro de reacción, el grupo químico transferido y el cofactor utilizado para la catálisis. El nivel final de clasificación define la especificidad sobre el sustrato. Por ejemplo, la papaína es una hidrolasa (EC 3), en particular una peptidasa (EC 3.4) que actúa sobre el aminoácido (EC 3.4.22) cisteína (EC 3.4.22.2) ^{35, 36}.

1.5.1. Papaína

La papaína es una enzima proteolítica similar a la pepsina humana, denominada proteasa o hidrolasa (proteínasa sulfhídrica). Según la clasificación internacional IUBMB corresponde al Nro. 3 de la clase de las hidrolasas (catalizan las reacciones hidrolíticas con transferencia de grupos funcionales al agua). La papaína pertenece a la sub-subclase de las cisteína proteasas cuya acción proteolítica depende de un grupo tiol nucleofílico (-SH) de un residuo de cisteína (Cys-25 en la papaína) por su actividad enzimática. Las cisteína proteasas son funcionalmente diversas y ampliamente distribuidas en la naturaleza ^{37, 38}.

La papaína es una enzima aislada del látex de la fruta verdosa de *Carica papaya*. Primero fue aislada en forma cristalina por Balls y sus colaboradores, y más tarde por Kimmel y Smith a partir del látex seco. Desde entonces, la enzima ha sido ampliamente estudiada y sus propiedades fueron revisadas por Kimmel y Smith en 1960 ³⁹. Su estructura a 1,65 Å de resolución se observa a través de la figura 7.

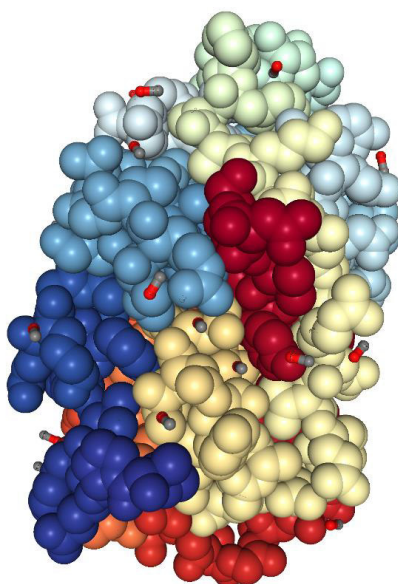


Figura 7. Estructura de papaína refinada a 1,65 Å de resolución.
Fuente: www.rcsb.org/3d-view/9PAP.

Del mismo modo las características estructurales de esta enzima quedan descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Características estructurales de la papaína

Peso molecular	:	24426,56
Código brookhaven	:	9PAP
Código EC*	:	3.4.22.2
Número de cadenas	:	1 (A)
Número de grupos o residuos	:	212 (209)
Número de átomos	:	1713
Número de enlaces	:	1721
Pliegues	:	Cistein-proteinasa (comprende 1 alfa-hélice y 4 cuerdas antiparalelas de hojas-beta que contiene la triada catalizadora Cys-His-Asn.
Especie vegetal	:	Papaya (<i>Carica papaya</i>)

Fuente: www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/.

Así mismo, a través de la figura 8, se muestran los datos PDB de la secuencia de la estructura secundaria de la cadena A de la papaína.

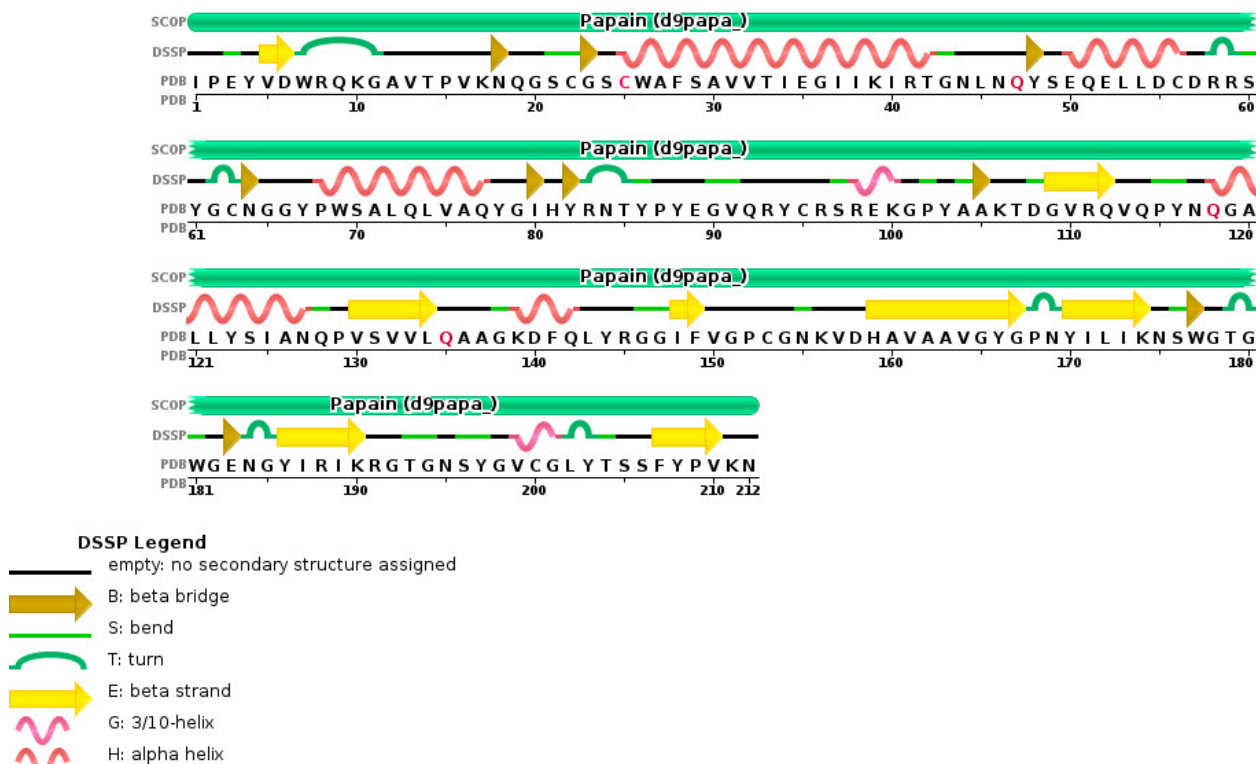


Figura 8. Estructura secundaria de la cadena A de la papaína. Posee 212 residuos con 25% de α -hélices y 21% de hojas beta.

Fuente: www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=9PAP.

La papaína es una proteína globular que consiste en una sola cadena polipeptídica de 212 residuos⁴⁰, plegada para formar dos dominios con una hendidura entre ellos.

El residuo de cisteína del sitio activo (Cys-25) es parte de la α -hélice L1 en la superficie del dominio izquierdo, mientras que la histidina (His-159) está en una hoja β en la superficie del dominio derecho de la enzima.

La existencia de estos dos grupos ionizables como residuos catalíticos esenciales en la papaína es consistente con la dependencia del pH de la actividad en esta enzima. La extremidad ácida, con pK_a de 4, generalmente se atribuye a la ionización de Cys-25, mientras que la extremidad básica, con pK_a de 8,5, se considera que refleja la ionización de His-159. En general, los valores de pK_a de los grupos cisteína e histidina en las proteínas son aproximadamente de 8 a 9, y 6, respectivamente⁴¹.

Es así como la actividad de la papaína depende del establecimiento de un par de iones de sitio activo entre los residuos de cisteína e histidina, tal como se muestra en la figura 9.

Muchos otros residuos, tanto al interior como alrededor del sitio activo, se consideran de importancia para el buen funcionamiento de la enzima en base a la comparación de las secuencias de aminoácidos y las estructuras de rayos X disponibles.

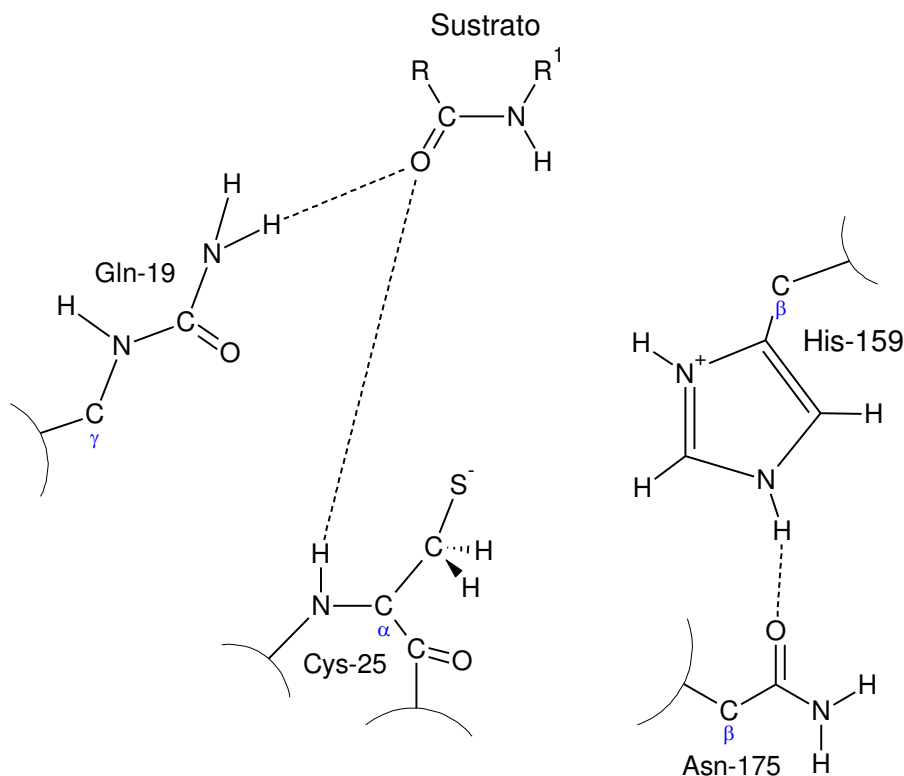


Figura 9. Geometría del sitio activo de la cisteína proteasa que muestra el par de iones cisteína-histidina. El C=O del enlace peptídico escindible del sustrato se dirige hacia un orificio del oxoanión formado a partir de la cadena principal NH de la cisteína y el grupo NH de la cadena lateral de la amida de la glutamina ⁴¹. (Se usa la numeración de la secuencia de la papaína).

La papaína degrada o hidroliza las proteínas hasta aminoácidos. Su actividad enzimática óptima a pH 5-8 se ha estudiado sobre diversos sustratos, siendo de los más accesibles experimentalmente los relacionados con la caseína ³⁷. Además, es una enzima termoestable, ya que las proteínas presentes en el látex seco protegen la papaína de la desnaturalización por el calor.

La papaína presenta propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antioxidantes y puede ser empleada en el tratamiento de lesiones cutáneas. En la industria alimentaria, se emplea en el ablandamiento de cárnicos y derivados relacionados, evita la formación de turbiedad en los procesos de obtención de jugos y cervezas, así como ser parte de suplementos dietarios debido a su capacidad de favorecer el proceso digestivo. En el campo de la inmunohematología, la papaína es capaz de aglutinar glóbulos rojos cubiertos de anticuerpos incompletos tanto *in vivo* como *in vitro*, entre otros ^{37,42}.

1.5.2. Caseína (Sustrato)

La caseína es una fosfoproteína presente en la fase soluble de la leche bovina y en algunos de sus derivados ³⁷. Como una clase de heteroproteína consta de varias subunidades (α , β y κ -caseína) que forman micelas con Ca^{2+} y $(\text{PO}_4)^{3-}$, esto brinda a la leche su aspecto blanquecino característico ⁴³. Las caseínas del género *Bos* fueron definidas originalmente por el Comité de Nomenclatura, Clasificación, y Metodología de Proteínas Lácteas (Jenness et al., 1956) como aquellas fosfoproteínas que precipitan de la leche desnatada cruda por acidificación a pH 4,6 a 20°C. En un informe posterior (Whitney et al., 1976), el Comité distinguió la caseína según su movilidad electroforética relativa. En un informe anterior, se recomendó que el uso de electroforesis como base para la clasificación se elimine y que la caseína se identifique de acuerdo con la homología de sus estructuras primarias (secuencia de aminoácidos) en las siguientes familias: α_{s1} -, α_{s2} -, β -, y κ -caseína ⁴⁴. Las especies individuales de estas familias aún pueden identificarse mediante técnicas electroforéticas en gel (Swaisgood et al., 1975). A continuación, se muestra la tabla 2 con alguna de las propiedades de las caseínas.

Tabla 2. Caseínas de leche bovina y algunas de sus propiedades ⁴⁴.

Proteína (Abreviatura sugerida)	Composición en leche descremada (g/L)	Variantes genéticas	Masa Molecular	Punto Isoeléctrico *
α_{s1} -Caseína (α_{s1} -CN)	12 – 15	B	23615	4,44 – 4,76
		C	23542	...
α_{s2} -Caseína (α_{s2} -CN)	3 – 4	A	25226	...
β -Caseína (β -CN)	9 – 11	A ¹	24023	...
		A ²	23983	4,83 – 5,07
		B	24092	---
κ -Caseína (κ -CN)	2 – 4	A	19037	5,45 – 5,77
		B	19006	5,3 – 5,8

* Absorción de una solución al 1% en una trayectoria de luz de 1 cm a 289 nm.

Las familias de caseína interaccionan entre ella formando una dispersión coloidal que consiste en partículas esféricas llamadas micelas. La formación de micelas de caseína *in vivo* fue postulada por Slaterry, la cual consiste en un proceso de dos pasos en el que monómeros de α_s -, β - y κ -caseína se agregan primero para formar submicelas de tamaño aproximadamente uniforme y composición variable, seguidos por la coalescencia de las submicelas a la estructura completa de las micelas. En este sentido, la polimerización de κ -caseína y la agregación de α_s : β -caseína no se consideran separados *in vivo*.

Una hipótesis contrastante es la de Talbot y Waugh que sugiere que, *in vivo*, las submicelas de caseína, compuestas de α_s - y β -caseínas, que se unen a partículas con dimensiones coloidales que son estabilizadas por la interacción en sus superficies con polímeros de SH- κ -caseína.

La hipótesis de Slattery se basó en las interacciones de α_s -, β -, SH- κ -caseínas en los experimentos de reconstitución y la relación entre la glicosilación de la κ -caseína y el tamaño de la micela. Talbot y Waugh derivaron sus ideas de las relaciones entre el tamaño de la κ -caseína y la capacidad de estabilización y transformación del tamaño de las micelas⁴⁵. La estructura y secuencia primaria de la κ -caseína se muestra en la figura 10.

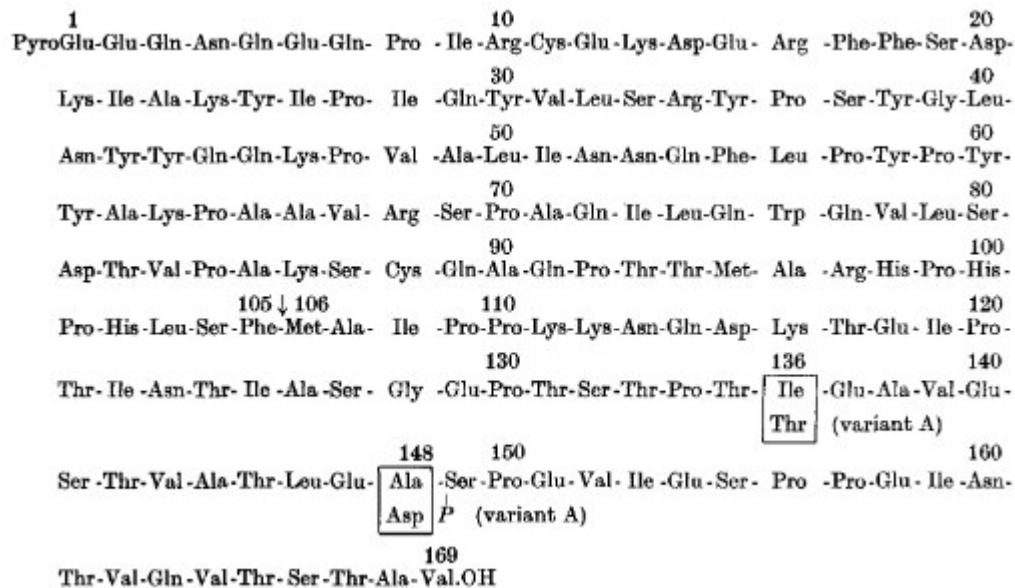


Figura 10. Estructura primaria de la κ -caseína (Mercier et al., 1973). Los residuos de aminoácidos corresponden a las diferencias de mutación entre las variables A y B⁴⁶.

1.6. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Existen varios métodos para la determinación de la actividad enzimática de la papaína. Cada uno posee cualidades de ventaja y desventaja y son empleados de acuerdo a los requerimientos particulares de tal determinación. Estos métodos son:

- **Método de Balls y Hoover**

Denominado como método de coagulación de la leche, es uno de los métodos más expeditos para determinar la actividad enzimática de una proteinasa. Se toma como índice de actividad proteolítica, el tiempo necesario para que una cantidad específica de enzima coagule un determinado volumen de solución de leche. Esta actividad se expresa en unidades de leche coagulada por gramo de solución enzimática. La unidad de leche

coagulada se define como la cantidad en peso de una solución enzimática necesaria para coagular 5 mL de solución láctea estándar por minuto, cuando la temperatura del medio es de 40°C y de pH 6. Un estudio acerca de la cinética del efecto de coagulación mostró que el tiempo requerido es una función de línea recta de la concentración de enzima, tal es el caso de la quimotripsina. La relación se expresa con precisión mediante una ecuación de la forma $(E - c) t = K'$.

La rapidez y simplicidad de este método, y la probable conexión entre el tiempo de coagulación y las propiedades proteolíticas de la papaína, hacen que la determinación del poder de coagulación sea una ayuda valiosa para describir la actividad de esta mezcla de enzimas ⁴⁷.

- **Método de Sørensen**

Conocido como titulación formólica. A través de este método se mide directamente la hidrólisis de una proteína-sustrato realizada cantidad delimitada de enzima. Cuando las uniones peptídicas se rompen, se liberan grupos $-\text{COOH}$ y NH_2 . Para efectuar la titulación de los grupos carboxílicos, los grupos básicos se bloquean con el aldehído fórmico. Los sustratos frecuentes se relacionan con la caseína ³⁷.

- **Método de Anson o Método de la Hemoglobina**

En este método, se hidroliza la hemoglobina desnaturalizada con la proteasa deseada a pH 7,5, temperatura de 25°C durante 10 min. La hemoglobina que no se hidrolizó se precipita con ácido tricloroacético (TCA) y al sobrenadante, después de filtrado, se le añade reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu que produce una coloración azul frente a la tirosina, triptófano y en menor grado con cistina, cisteína e histidina. La absorbancia se mide a 750 nm. Para obtener la línea de calibración se utiliza una proteína de actividad Anson conocida, usualmente tripsina pancreática, que se somete al mismo ensayo que la proteasa problema ⁴⁸.

- **Método de determinación de los productos de hidrólisis**

Este procedimiento se emplea para determinar la actividad proteolítica de la papaína, la ficina y la bromelina. El ensayo se basa en una hidrólisis proteolítica de 60 minutos de sustrato de caseína a pH 6 y 40°C. El sustrato no hidrolizado se precipita con ácido tricloroacético, el cual se elimina por filtración; la caseína solubilizada se mide por espectrofotometría ⁴⁹.

Este método tiene la ventaja de adaptarse a la espectroscopía UV o VIS, ya sea por la determinación de la tirosina liberada (UV) o por la determinación de aminoácidos liberados por la reacción con la ninhidrina (VIS) o finalmente por la determinación de caseína no hidrolizada por el método de Biuret (VIS) ³⁷. Adicionalmente, otro método para determinación proteica usando un reactivo de tinción es el método de Bradford.

La adición de un reactivo colorimétrico a una solución que contiene proteínas da como resultado un cambio en la solución ⁵⁰. Dos pruebas colorimétricas de proteínas utilizadas comúnmente son:

- **Prueba de Biuret**

El reactivo de Biuret cambia de azul claro a púrpura en presencia de proteína debido a la quelación de los iones cobre, presentes en la solución de Biuret, por la estructura del polipéptido ⁵⁰. Esta prueba se observa a través de la reacción química mostrada en la figura 11.

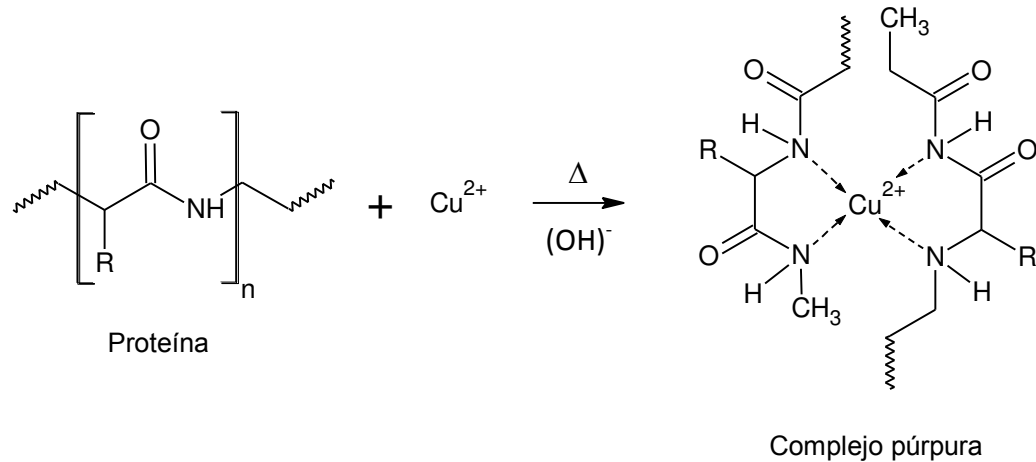


Figura 11. Reacción de formación del complejo púrpura entre el reactivo de Biuret y la proteína en medio alcalino ⁵⁰.

- **Prueba de Bradford**

El reactivo de Bradford pasa de un color marrón anaranjado a azul brillante cuando se mezcla con proteínas ⁵⁰, como resultado de la unión entre el tinte aromático azul brillante de Coomassie G-250 o R-250 (CBB) y los residuos de aminoácidos aromáticos cargados positivamente en una proteína. Estas interacciones se efectúan, específicamente, entre los residuos de aminoácidos básicos, arginina, lisina e histidina con el colorante azul brillante de Coomassie G-250 o R-250 (CBB) en una matriz ácida ⁵¹. El método se establece en la reacción de formación del complejo entre la proteína y la forma azul del tinte, según la figura 12, que absorbe intensamente la luz a 595 nm.

El método de Bradford se ha convertido en un método colorimétrico de elección, debido principalmente a su facilidad de rendimiento y velocidad de análisis, la alta sensibilidad y la linealidad percibida.

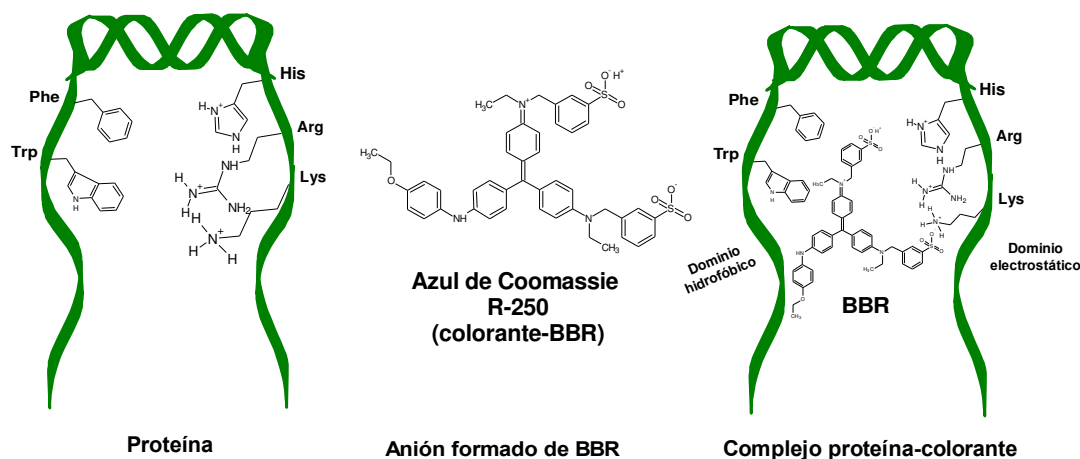


Figura 12. Formación del complejo proteína-BBR ⁵¹.

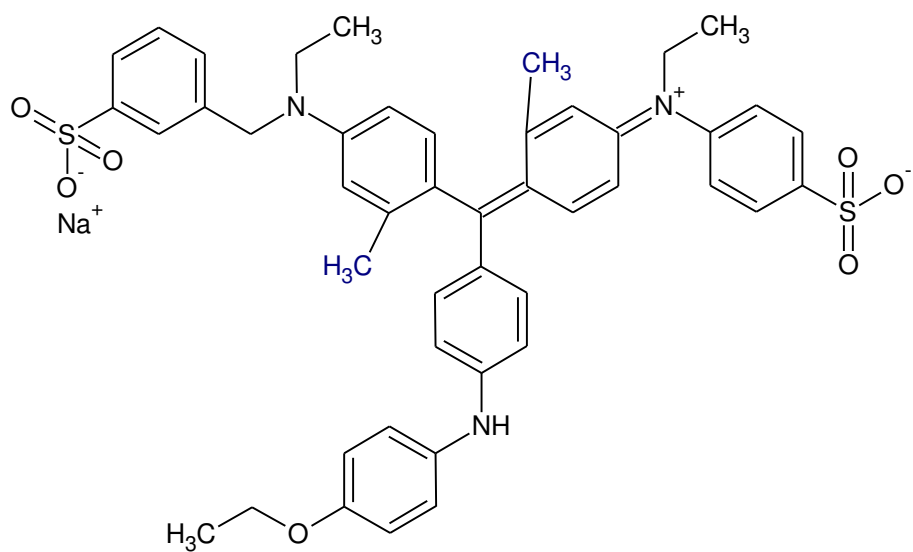
Fuente: Sherovski et al., 2018.

La determinación de proteínas se realiza mediante medición de la absorbancia en esta longitud de onda. Sin embargo, hay una ligera no linealidad del ensayo de Bradford en concentraciones sobre 10 µg/mL de BSA (M. M. Bradford, 1976), causada principalmente por la superposición en el espectro UV-Vis de las dos formas del colorante en equilibrio ácido-base al pH ácido habitual del ensayo. Además la unión proteína-colorante está en equilibrio, y la formación del complejo depende de la concentración de ambas especies. Las concentraciones variables producen otra distorsión de la respuesta lineal de este método.

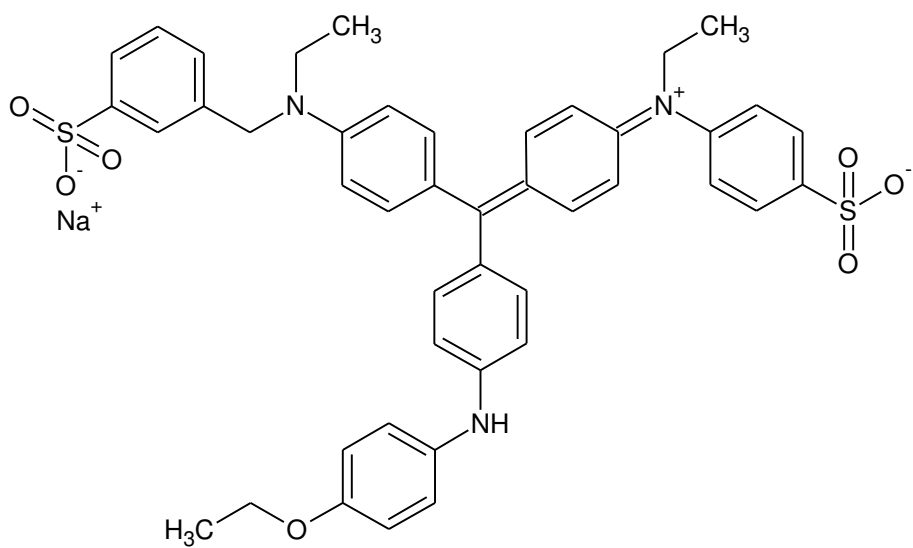
Muchos investigadores intentaron mejorar el problema de la no linealidad con modificaciones en la preparación del reactivo de color usando ácido perclórico o clórhídrico (Grintzalis et al., 2015), aumentando o disminuyendo la concentración del colorante e incluyendo dodecilsulfato de sodio (SDS) o fenol. Esos estudios ofrecieron sólo una solución parcial. Zor y Selinger ⁵² muestran que bajo condiciones de trabajo estándar, la relación de absorbancias A_{595}/A_{450} es estrictamente lineal con concentración de proteínas en el rango de 0,2 a 20 µg/mL.

Se sabe que los tintes brillantes de Coomassie se usan para teñir proteínas en gel de poliacrilamida en electroforesis o como lo ya expuesto para determinar la concentración de proteínas en una solución, los tintes de Coomassie más comúnmente usados en laboratorio son el azul brillante G-250 (BBG) y el azul brillante R-250 (BBR) ⁵³ (figura 13). Estos colorantes se unen a las proteínas a través de la fisorción a los aminoácidos aromáticos y otros aminoácidos (arginina, prolina), y la estrecha interacción es rápida, especialmente para BBG.

Estructuralmente, el BBG se diferencia del BBR por la presencia de grupos metilo unidos a dos anillos aromáticos.



(a)



(b)

Figura 13. Estructuras del azul brillante de Coomassie G-250 (a) y del azul brillante de Coomassie R-250 (b) ⁵³.

1.7. INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA

La inmovilización es un proceso por el cual se confina o se localiza un tipo de enzima en una región espacial definida o fase, que da lugar a sistemas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas reiteradamente ⁵⁴. Posteriormente, al restringir, completa o parcialmente los grados de libertad del movimiento enzimático permiten el intercambio o difusión de sustancias.

El uso de enzimas inmovilizadas destaca las siguientes ventajas:

- El aumento de estabilidad enzimática.
- La posible reutilización enzimática.
- El diseño de métodos cuyas condiciones de trabajo (pH, temperatura) sean fácilmente manejadas y controladas.

Mientras que las desventajas de este proceso son:

- La alteración conformacional de la enzima frente a su estado nativo.
- Fases heterogéneas del sistema enzima-soporte donde pueden hallarse fracciones de proteínas inmovilizadas con distinto número de uniones al soporte.
- Pérdida de actividad enzimática.

1.7.1. Métodos de inmovilización de enzimas

Acorde con las formas de interacción entre las enzimas y los soportes ^{55, 56}, los métodos de inmovilización pueden clasificarse en métodos físicos y métodos químicos. Se asignan como métodos físicos a los procesos de adsorción y atrapamiento, en los que no hay interacciones covalentes de enzimas frente a soportes, mientras que la unión covalente y la reticulación pertenecen a los métodos químicos. En algunos casos, existen múltiples interacciones entre enzimas y soportes que son de carácter de estudio para la inmovilización enzimática.

A) Métodos físicos

A.1. Adsorción

Es un método simple y conveniente para la inmovilización de enzimas, debido a la presencia de fenómenos físicos tales como: Adsorción física, adsorción de iones y adsorción por afinidad, entre los cuales la adsorción física es usualmente resaltante.

En este modo de inmovilización, los soportes comúnmente utilizados son resinas de intercambio catiónico y aniónico, carbón activado, sílice, gel, alúmina, vidrio de poro específico y cerámica. En este método no hay agentes de acoplamiento adicional y son requeridos pasos de modificación para la inmovilización de enzimas y además, las matrices de soporte pueden ser regeneradas.

Por otra parte, las condiciones de inmovilización son levemente perjudiciales para las enzimas en la preservación de sus actividades catalíticas iniciales. Sin embargo, en la adsorción física las interacciones entre enzimas y su inmovilización en soportes son débiles y reversibles. Por tanto, las fuerzas implicadas son susceptibles a cambios de pH, temperatura, fuerza iónica, dando escasa estabilidad.

A.2. Atrapamiento

Reside en la retención física de las enzimas dentro de cavidades interiores o poros de soportes constituidos generalmente de prepolímeros fotoentrecruzables como también de polímeros sintéticos (poliacrilamida, poliuretano) o naturales (colágeno, alginato, agar, quitosano). Es un método de inmovilización en que las enzimas se encuentran ocluidas en redes poliméricas.

En este método las enzimas se inmovilizan mediante atrapamiento en gel/fibra o microencapsulación. Las enzimas quedan retenidas en las redes mientras que los sustratos y los productos pueden sufrir difusión, lo que permite disminuir la lixiviación enzimática, mejorar la estabilidad y generar reacciones enzimáticas.

Como no existe enlaces covalentes entre enzimas y matrices de soporte, las conformaciones enzimáticas se mantienen, asegurando altas actividades catalíticas. Sin embargo, las barreras de alta difusión evitan el paso de sustratos macromoleculares a través de las redes, lo cual es el principal demérito de esta técnica.

B) Métodos químicos

B.1. Unión covalente

La unión o fijación covalente es un método convencional para la inmovilización de enzimas. Consiste en la formación de enlaces covalentes entre la matriz del soporte y los aminoácidos nucleofílicos de la enzima como lisina (Lys), cisteína (Cys), histidina (His); y en con menor formación de enlaces frente al ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu). Además, grupos funcionales amino, grupos carboxílicos, grupos imidazólicos, grupos indólicos y grupos fenólicos son favorables para la formación de enlaces covalentes.

Estos enlaces covalentes son estables evitando así la pérdida de estructuras enzimáticas unidas al soporte, de esta manera, se mejora la estabilidad del proceso de inmovilización enzimática.

Sin embargo, los sitios activos de las enzimas podrían inactivarse debido a las reacciones químicas entre las enzimas y las matrices soporte, lo que conlleva a la disminución de actividades catalíticas.

Una técnica comúnmente empleada para inmovilizar una enzima es por acoplamiento de glutaraldehído. En este proceso, un grupo aldehído de la molécula de glutaraldehído

reacciona con el grupo amino de la molécula enzimática, mientras que el otro grupo aldehído reacciona con el grupo amino del soporte.

B.2. Reticulación

También llamado entrecruzamiento o *cross-linking*, se basa en uniones intermoleculares de enzimas por uso de reactivos bifuncionales. En esta técnica, las enzimas se inmovilizan firmemente mejorando su estabilidad y reutilización. Sin embargo, las enzimas pueden perder su actividad catalítica durante el proceso de reutilización.

Como reactivos bifuncionales comúnmente empleados para esta técnica están: Glutaraldehído, isocianato y N, N'-etileno dimaleimida, siendo el glutaraldehído el más utilizado.

Los enlaces intermoleculares entre las enzimas como resultado de la reticulación son irreversibles, los cuales son capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. De ello, otro enfoque de estudio es la **co-reticulación**, que consiste en el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y dotada de residuos de lisina, esto permite la eliminación de pérdidas de actividad enzimática por efectos de difusión.

Actualmente, una técnica novedosa de cross-linking consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído (Cross-Linked Enzyme Crystals o CLECs). Para la preparación de CLEAs, los precipitantes (sulfato de amonio) deben ser empleados en primer lugar, luego usando reactivos bifuncionales, las enzimas agregadas se entrecruzan. Después de la agregación, los sitios activos de las enzimas están protegidos, preservando así las actividades catalíticas.

1.7.2. Clasificación de soportes

La inmovilización por unión a soportes es una de las técnicas más utilizadas para procesos de catálisis enzimática. La elección del soporte y el tipo de enlace resultan imprescindibles en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe tratar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles interferencias microbianas. Además el soporte debe poseer resistencia mecánica a las condiciones de trabajo del reactor y ser fácilmente separado del medio líquido para su reutilización.

Se han empleado una gran variedad de materiales como **soportes** para inmovilizar numerosas enzimas. Estos materiales se diferencian en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente los encontramos en forma cilíndrica, de hojas, de fibras y comúnmente en forma de esferas. Los soportes pueden clasificarse en dos grupos:

- **Soportes inorgánicos.** Dentro de este grupo se tiene gran variedad de soportes, que pueden ser naturales (arcillas como bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) o materiales

(óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.).

- **Soportes orgánicos.** Se pueden clasificar en:
 - **Polímeros naturales:** Divididos en:
 - **Polisacáridos:** Celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, quitosano, etc.
 - **Proteínas fibrosas:** Colágeno, queratina, etc.
 - **Polímeros sintéticos:** Divididos en:
 - **Poliolefinas:** Poliestireno
 - **Polímeros acrílicos:** Poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.
 - **Otros tipos:** Alcohol polivinílico, poliamidas, etc.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA DE TRABAJO

2.1. PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL

En el marco del desarrollo de ensayos para la comprobación de la hipótesis se ha diseñado el plan experimental según el esquema de la figura 14.

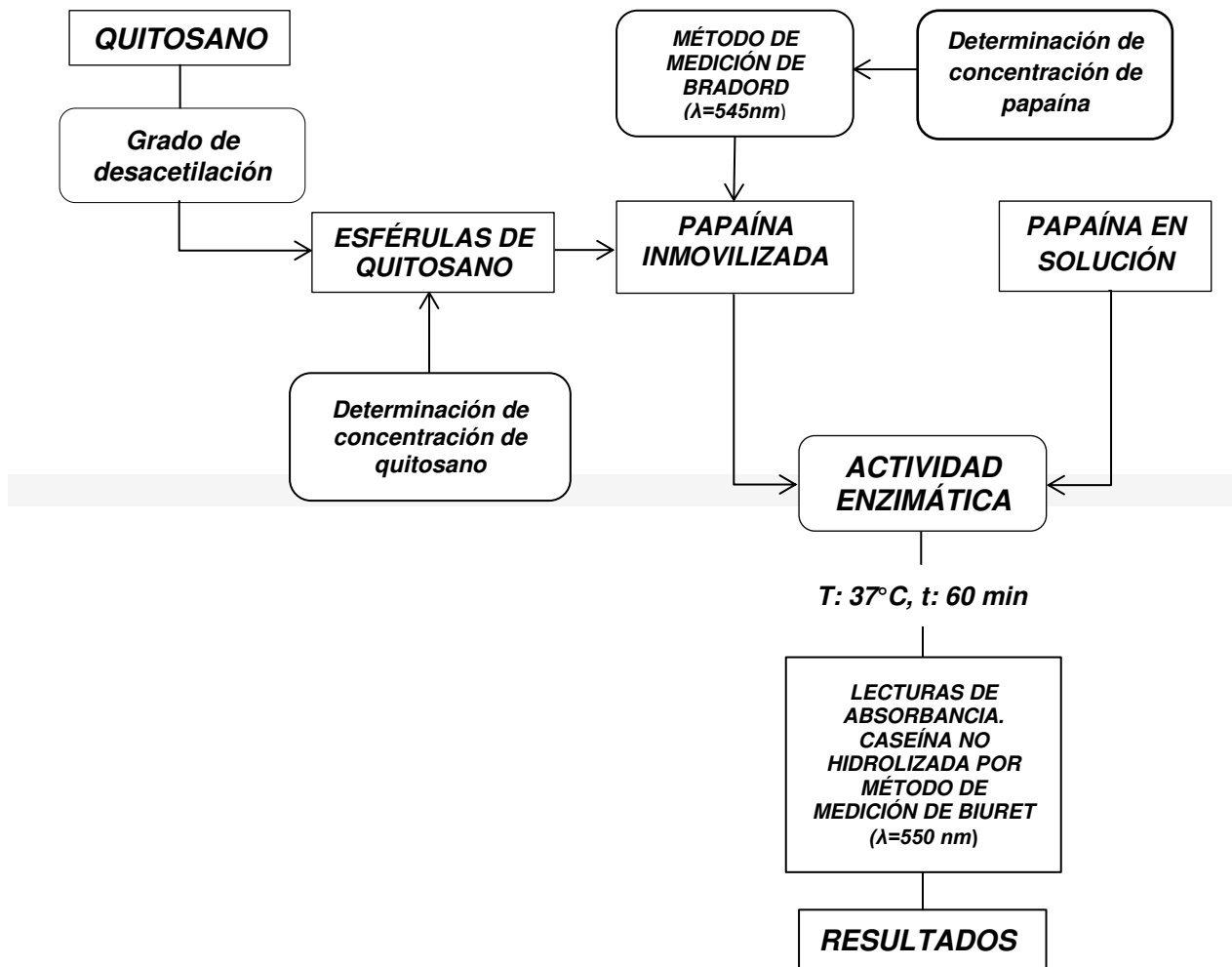


Figura 14. Plan general del desarrollo experimental.

2.2. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIALES

2.2.1. Reactivos

- Quitosano en polvo grado alimentario de 90,3% de pureza
- Solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,1N
- Solución estandarizada de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1N
- Ácido acético (CH₃COOH) al 99,0% v/v
- Papaína liofilizada P5306, Sigma-Aldrich
- Papaína nativa (látex de *Carica papaya*) tamizada a través de malla de 20 µm
- Caseína de leche bovino, Merck
- Solución de glutaraldehído al 25% v/v, Sigma-Aldrich
- Fosfato disódico anhidro (Na₂HPO₄)
- Fosfato monopotásico (KH₂PO₄)
- Ácido tricloroacético (C₂HCl₃O₂). Cristales sólidos al 98% de pureza.
- Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·5H₂O)
- Tartrato de sodio y potasio (KNaC₄H₄O₆·4H₂O)
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,05N
- Azul de Coomassie R-250
- Ácido fosfórico al 85% v/v
- Etanol al 95 y 96% v/v
- Agua desionizada y de grado HPLC

2.2.2. Aparatos

- Balanza analítica electrónica digital M-Power marca Sartorius (máx. 210 g ± 0,001g)
- Balanza analítica electrónica digital ACCULAB marca Sartorius (máx. 210 g ± 0,0001 g)
- Agitador magnético de 230 voltios marca Fisher Scientific
- Plancha de calentamiento (Temp. 0-310°C) con agitador magnético (Mot. 0-1500 rpm), serie RCT basic, marca Ika
- pH/mV-metro con microprocesador PHS-25CW marca TKR (calibrado con buffers pH 4,00 y pH 6,86 y protocolos normalizados)
- Cronómetro serie F-201 WA-1A marca Casio (1/100 seg. ± 0,01 seg.)
- Micrómetro digital marca Mitutoyo (0-25 mm ± 0,001 mm)
- Cocinilla eléctrica
- Horno-estufa eléctrica marca Black & Decker
- Centrífuga (06 compartimientos), serie GT119-100T, marca Greetmed
- Centrífuga (06 compartimientos), serie 800D, marca Greetmed
- Espectrofotómetro Vis, serie NV-203, marca Greetmed

2.2.3. Materiales

- Vasos de precipitado de 25, 50, 100 y 250 mL

- Vaso de precipitado de 1000 mL
- Matraces volumétricos de 50 y 100 mL
- Tubos de ensayo de 4 y 6 mL
- Pipetas volumétricas de 10 y 20 mL
- Pipetas graduadas de 1 y 10 mL
- Pipetas Pasteur de 1 mL
- Embudo de vidrio
- Lunas de reloj
- Gradillas para tubos de prueba de 6 y 18 compartimentos
- Viales para cromatografía de 1,5 mL
- Micropipeta monocal Transferpette S, tipo variable (10-100 $\mu\text{L} \pm 0,6\mu\text{L}$), marca Brand
- Micropipeta monocal, tipo variable (100-1000 $\mu\text{L} \pm 0,80 \mu\text{L}$), marca Boeco
- Bureta de 25 mL
- Viscosímetro de Ostwald (bulbo superior de 6,2 mL; bulbo inferior de 9 mL; $\phi_{\text{interno}} = 0,55 \pm 0,02 \text{ mm}$)
- Termómetro de mercurio marca Boeco ($-10 \text{ a } 110^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$)
- Propipeta de goma
- Soporte universal
- Pinza y nuez doble
- Tips para micropipeta de 200 y 1000 μL
- Filtro grado 42, Whatman
- Jeringas hipodérmicas (especificación: 21 G x 1/2") de 5 mL
- Filtros de jeringa (acetato de celulosa) de 0,45 μm marca Filter-Lab

2.3. PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1. Caracterización y determinación de pureza de quitosano

2.3.1.1. Grado de desacetilación

- **Muestra.** Se pesó 0,1022 gramos de quitosano en polvo en un vaso de 100 mL. Se disolvió el polímero con 20 mL de HCl 0,1N medido con una pipeta volumétrica. Luego la solución fue homogenizada bajo agitación hasta su completa disolución luego de 20 minutos.
- **Titulación potenciométrica.** Se armó el equipo de titulación potenciométrica conformado por una bureta de 25 mL que contenía la solución estandarizada de NaOH 0,0946N (solución valorante) y un potenciómetro cuyo electrodo estuvo sumergido dentro de la solución de quitosano en medio ácido bajo agitación magnética (figura 15). Durante el ensayo de titulación se tomaron lecturas de pH cada vez que se añadió 0,1 mL de solución valorante. Las lecturas fueron tomadas bajo señales eléctricas constantes relacionadas con el intercambio iónico, por tanto se cuidó que el bulbo de vidrio del electrodo no chocara con la pastilla magnética ni con las paredes del vaso a fin de no ocasionar interferentes en dichas señales. Se observaron dos saltos de pH

relacionados con los puntos de equivalencia, por lo que el intercambio demoró en estabilizarse.

Finalmente el ensayo culminó hasta llegar a valores de pH cercanos a 12, evitando la sobresaturación del bulbo por precipitación de sales.

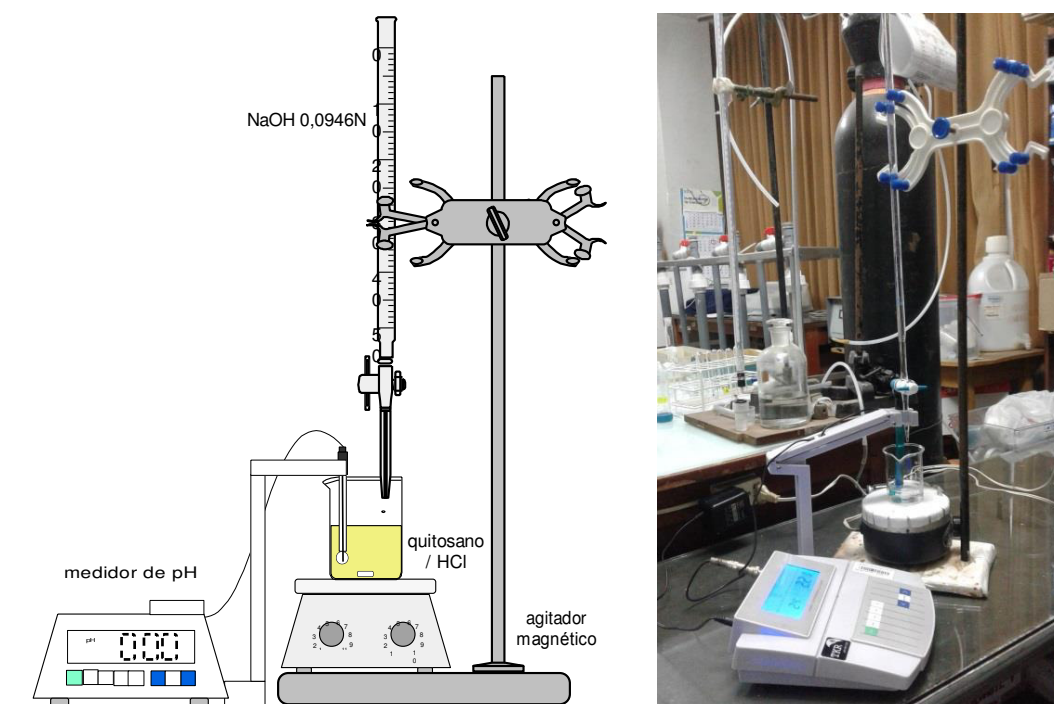


Figura 15. Equipo de titulación potenciométrica.

2.3.1.2. Cuantificación de quitosano por viscosimetría capilar

El objetivo de esta parte experimental fue desarrollar un procedimiento para la determinación de la concentración de quitosano en muestras en polvo utilizando un patrón de quitosano mediante la técnica de viscosimetría capilar de Ostwald.

- **Muestras.** Se prepararon soluciones^{57, 58} de quitosano a concentraciones desde 0,0005 hasta 0,0100 g/mL a volúmenes de 10 mL HCl 0,1N medidos con una pipeta volumétrica en vasos de 25 mL. Cada solución se preparó bajo agitación magnética durante 20 minutos. Culminadas las disoluciones en medio ácido se tomaron lecturas de pH. Las condiciones de preparación quedan especificadas en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de preparación de soluciones de quitosano.

Concentración (g/mL)	W _{quitosano} (g)	V _{final} (mL)	pH
0,0000	-----	10	1,20
0,0005	0,0051	10	1,22
0,0010	0,0105	10	1,25
0,0015	0,0150	10	1,22
0,0020	0,0205	10	1,20
0,0025	0,0254	10	1,23
0,0030	0,0311	10	1,23
0,0050	0,0511	10	1,25
0,0075	0,0751	10	1,27
0,0100	0,1012	10	1,27

- **Determinación de viscosidad.** Se procedió a medir los tiempos de flujo ^{59, 60, 61} de las soluciones de la tabla 3, con un cronómetro a 20, 30, 40 y 50°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) dentro del equipo de determinación de viscosimetría (figura 16). Los tiempos fueron medidos por quintuplicado después de alcanzar el equilibrio térmico. Previo a cada medición se realizó la limpieza del viscosímetro de Ostwald.



Figura 16. Equipo de determinación de la viscosidad.
Fuente: Fotografía del autor.

2.3.2. Obtención de esférulas de quitosano

- **Muestra.** Se pesó 0,2512 gramos de quitosano en polvo en un vaso de 25 mL, los cuales se disolvieron con 12,5 mL de CH_3COOH 5% v/v empleando una pipeta graduada de 10 mL. La solución fue homogenizada bajo agitación magnética hasta una completa disolución del polímero.
- **Obtención de esférulas.** Utilizando una pipeta Pasteur se aspiró un volumen cerca de 1 mL de solución de quitosano/ CH_3COOH , dejando caer esta por goteo a una altura de 1cm, aproximadamente, sobre 20 mL de solución de NaOH 2,0 M (agente precipitante)^{62, 63} en un vaso de 50 mL (figura 17). La formación de esférulas se efectuó sin agitación magnética. Este proceso empezó con la aparición de pequeñas circunferencias en la superficie del agente precipitante. Finalmente, conforme avanzó el tiempo se consolidó esta formación con la precipitación de esférulas sobre la base del vaso. Las esférulas formadas tuvieron un color blanquecino de textura gelatinosa.

Las esférulas obtenidas fueron filtradas y lavadas con agua desionizada hasta pH 7,00. Luego de filtrarlas se midió su diámetro empleando un micrómetro digital. Obtenidas las esférulas, estas fueron refrigeradas en agua desionizada.

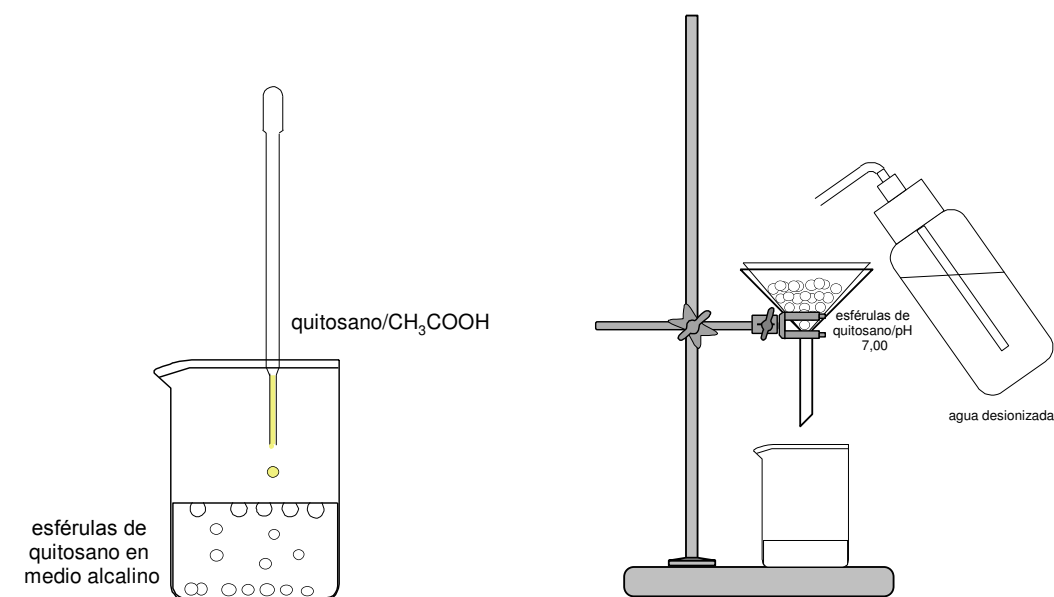


Figura 17. Formación y filtración de esférulas de quitosano.
Fuente: Diagrama del autor.

2.3.3. Actividad enzimática de papaína inmovilizada y en solución

- **Soluciones de papaína.** Se prepararon dos soluciones de papaína (papaína P5306, papaína nativa), pesándose las muestras en viales para cromatografía. Estas muestras se disolvieron en buffer fosfato pH 7,00 hasta un volumen de 1,5 mL. En el caso de la

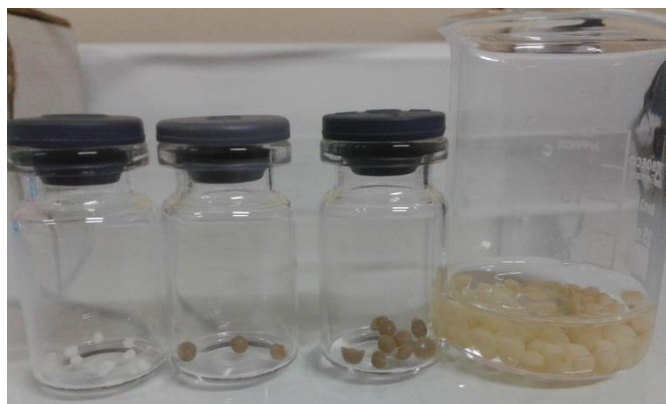
preparación de la solución de papaína nativa se requirió sonicación para su completa disolución.

Finalmente para fines del estudio se prepararon diluciones a 100 y 1000 ppm.

- **Solución de caseína (sustrato).** Se pesó 0,0448 g de caseína en polvo en un tubo de ensayo, la cual se disolvió con buffer fosfato pH 7,00 hasta un volumen de 4 mL. Para completar la disolución se empleó sonicación. Como no hubo efecto, se empleó calor con un mechero de alcohol. La concentración de la solución fue de 11088 ppm. Finalmente, se tomó un volumen de 1,8 mL de esta solución, para preparar otra solución de 1000 ppm, esta solución se completó hasta un volumen de 20 mL con buffer fosfato pH 7,00 en un tubo de ensayo. La primera solución preparada fue conservada para posteriores pruebas bajo refrigeración.
- **Buffer fosfato pH 7,00 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$).** Se preparó 100 mL de buffer según norma 4010200 de la European Pharmacopoeia 5.0. El pH experimental fue 7,02.
- **Inmovilización de papaína en esférulas de quitosano.** Las esférulas refrigeradas fueron filtradas y enjuagadas con agua desionizada. Luego fueron depositadas en 10 mL de glutaraldehído al 3 % v/v durante 1 hora (proceso de activación) ^{26, 64}. Las esférulas se tornaron de color amarillo (figura 18). Después de ser nuevamente filtradas y enjuagadas, estas esférulas fueron depositadas en 10 mL de buffer fosfato pH 7,00 durante 1 hora. Finalmente, las esférulas fueron agrupadas en 14 a 17 unidades e introducidas en 2000 μL de soluciones de papaína patrón y nativa de 100 y 1000 ppm. Estas esférulas en solución enzimática tuvieron un reposo de 1 semana en refrigeración. Acabado el tiempo de reposo las esférulas tomaron un color marrón claro, siendo evidencia cualitativa del proceso de inmovilización.



(a)



(b)

Figura 18. (a) Esférulas de quitosano con glutaraldehído. (b), Esférulas en buffer pH 7,00 con papaína inmovilizada.

❖ ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PAPAÍNA INMOVILIZADA

- **Condiciones experimentales.** Se estableció las condiciones de trabajo, según las especificaciones de la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones experimentales utilizadas para determinar la actividad enzimática de papaína inmovilizada[‡].

Baño Termostático T =37°C Tiempo=60 min	TUBO	Caseína 1000 ppm / Buffer pH =7,00 (µL)	Papaína 100 ppm / Buffer pH=7,00 (Esférulas)	Buffer pH =7,00 (µL)
	A	2000	-----	400
	B	2000	(10-12 esféulas)	-----

[‡]Las condiciones de esta tabla fueron también empleadas en la determinación de actividad enzimática de solución de papaína de 1000 ppm.

- **Determinación de actividad enzimática.** Para la medición de actividad enzimática en función del tiempo, se tomaron muestras de 400 µL de los tubos A y B para los tiempos de 0, 15, 30 y 60 minutos. Estas muestras se depositaron en tubos de ensayo con 600 µL de H₂O y 200 µL de ácido tricloroacético al 20% v/v. La acción del ácido tricloroacético precipitó la caseína no hidrolizada. Luego de centrifugar los tubos a 3500 rpm por 5 minutos, se separó la proteína no hidrolizada, se retiró el exceso de ácido tricloroacético en el interior de los tubos con papel toalla usando una pinza. La concentración de proteína no hidrolizada se analizó por método de Biuret previa redisolución con 1000 µL de NaOH 0,05N y 200 µL de reactivo de Biuret (figura 19). Para la formación del complejo color púrpura se requirió calor empleando un mechero de alcohol. Las esféulas utilizadas fueron sometidas a un baño de buffer fosfato pH 7,00 para el enjuague, estas luego fueron refrigeradas para reutilización (figura 20).

La determinación de concentración de proteínas no hidrolizadas por espectroscopía visible se realizó a través de cubetas de vidrio a una longitud de onda de 550 nm (figura 21). Finalmente, se estableció de forma previa una curva de calibración ($\lambda=550$ nm), según la tabla 5 y figura 23.

Tabla 5. Condiciones de preparación de la curva de calibración.

Tubo	Caseína 1000ppm / Buffer pH 7,00 (µL)	Agua (µL)	TCA-20% (µL)	NaOH 0,05N (µL)	BIURET (µL)
1	0	800	200	1000	200
2	100	700	200	1000	200
3	200	600	200	1000	200
4	400	400	200	1000	200
5	600	200	200	1000	200

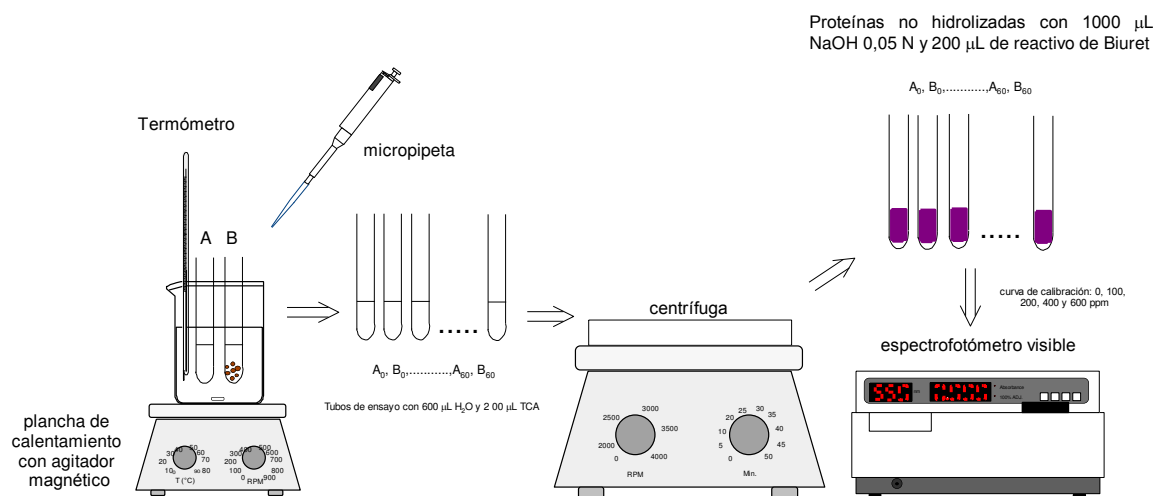


Figura 19. Determinación de concentración de caseína no hidrolizada (actividad enzimática de papaína inmovilizada). Fuente: Esquema del autor.



Figura 20. Reacción de papaína inmovilizada sobre caseína. Fuente: Fotografía del autor.

❖ ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PAPAÍNA EN SOLUCIÓN

- **Condiciones experimentales.** Se estableció las condiciones de trabajo, según la especificación expuesta en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones experimentales utilizadas para la determinación de actividad enzimática en solución[‡].

Baño Termostático T =37°C Tiempo=60 min	TUBO	Caseína 1000 ppm / Buffer pH 7,00 (μL)	Papaína 100 ppm / Buffer pH 7,00 (μL)	Buffer pH 7,00 (μL)
	A	2000	-----	400
	B	2000	400	-----
	C	2000	200	200

[‡] Las condiciones de esta tabla fueron también empleadas en la determinación de actividad enzimática de solución de papaína de 1000 ppm.

- **Determinación de actividad enzimática.** Para la medición de la actividad enzimática en función del tiempo, se tomaron muestras de 400 μL de los tubos A, B y C para tiempos de 0, 15, 30 y 60 minutos. Estas muestras se depositaron en tubos de ensayo con 600 μL de H₂O y 200 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% v/v. El ácido tricloroacético (TCA) precipitó la caseína no hidrolizada. Luego de centrifugar los tubos a 3500 rpm por 5 minutos, se separó cuantitativamente la proteína no hidrolizada, se retiró el exceso de ácido en el interior de los tubos con papel toalla usando una pinza. La concentración de caseína no hidrolizada se analizó por el método de Biuret previa redisolución con 1000 μL de NaOH 0,05N y 200μL de reactivo de Biuret. Para la formación del complejo color púrpura se calentó usando un mechero de alcohol (figura 21). La determinación de concentración de proteínas no hidrolizadas por espectroscopía visible fue bajo las mismas condiciones que en las pruebas de actividad de enzima inmovilizada.

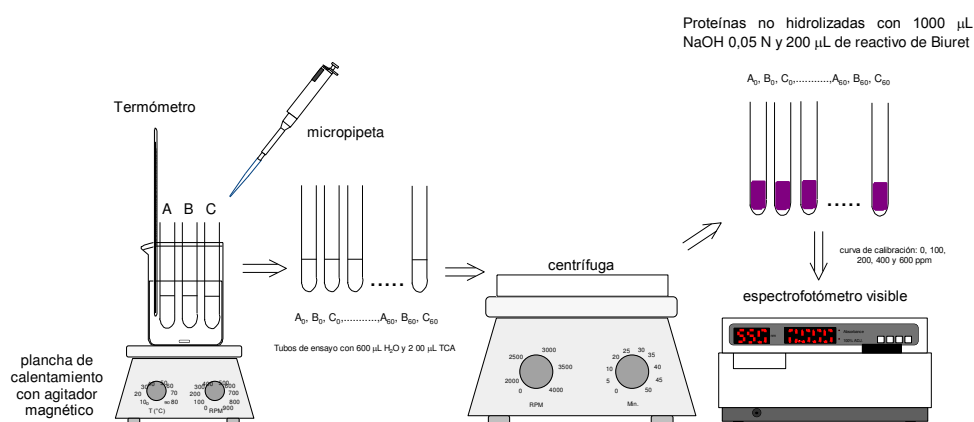


Figura 21. Determinación de concentración de caseína no hidrolizada (actividad enzimática de papaína en solución).

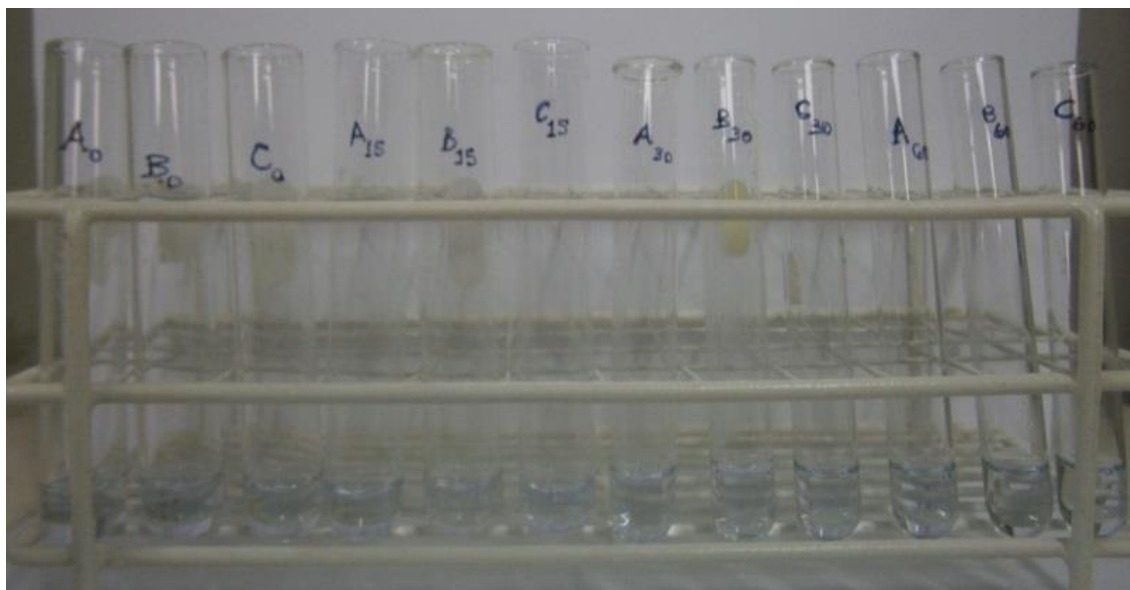


Figura 22. Soluciones de caseína no hidrolizada.

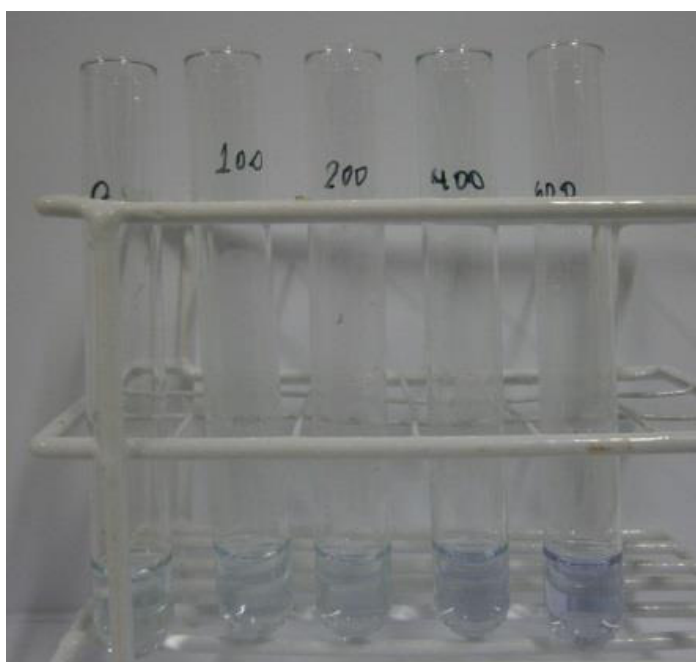


Figura 23. Soluciones de concentración estándar para curva de calibración.

2.3.4. Determinación de concentración de quitosano en esférulas por viscosimetría capilar

- **Muestras.** Se agregó por triplicado sobre vasos de 25 mL 10 esférulas de quitosano, las cuales fueron disueltas con 10 mL de HCl 0,1N medido con una pipeta volumétrica. Así mismo se estableció una curva de calibración con soluciones estándar de quitosano empleando concentraciones desde 0,0005 hasta 0,0030 g/mL. Cada solución se preparó bajo agitación durante 20 minutos. Luego a las soluciones en medio ácido se realizaron lecturas de pH.

Las condiciones de preparación de la curva de calibración se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de preparación

Concentración (g/mL)	W _{quitosano} (g)	V _{final} (mL)	pH
0,0000	-----	10	1,20
0,0005	0,0051	10	1,22
0,0010	0,0105	10	1,25
0,0015	0,0150	10	1,22
0,0020	0,0205	10	1,20
0,0025	0,0254	10	1,23
0,0030	0,0311	10	1,23

- **Determinación de la viscosidad.** Se procedió a medir los tiempos de flujo tanto de las soluciones de la tabla 7 como de las soluciones de muestra problema con un cronómetro a $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ dentro del equipo de determinación de viscosidad (figura 24). Los tiempos de flujo fueron medidos por quintuplicado después de alcanzar el equilibrio térmico del equipo. Previo a cada medición se realizó la limpieza del viscosímetro de Ostwald.

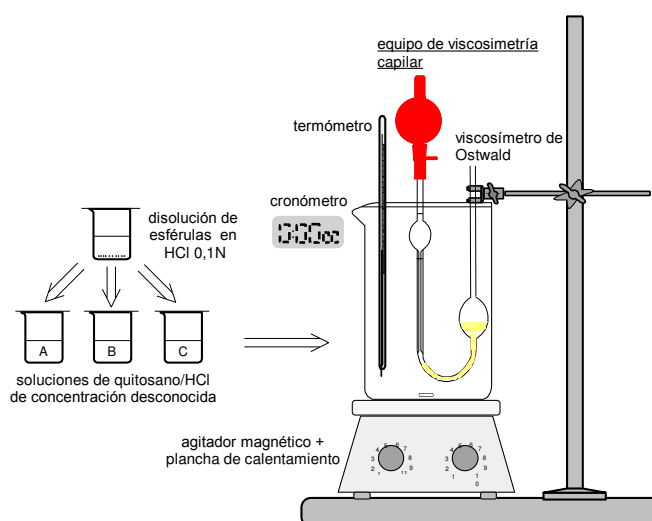


Figura 24. Determinación de concentración de quitosano en esférulas.

2.3.4. Determinación de concentración de papaína en esférulas por método de Bradford

- **Reactivo de Bradford**

- **Bradford 1.** Se pesó 0,0136 g de azul brillante de Coomassie R-250, este fue agregado a 6,7 mL de C_2H_5OH 96% v/v más 13,4 mL de H_3PO_4 85% v/v, completándose hasta 25 mL con agua de grado HPLC.
- **Bradford 2.** Preparado en un vaso de 25 mL, se adicionó 1mL de solución Bradford 1, 2 mL de C_2H_5OH 95% v/v, 4 mL de H_3PO_4 85% v/v y 7 mL de agua de grado HPLC. La solución tomó un color verde esmeralda (figura 25).



Figura 25. Solución Bradford 2.

- **Muestras.** Se pesaron en tubos de ensayo 03 muestras de esférulas con papaína inmovilizada, clasificadas de acuerdo a la tabla 8.

Tabla 8. Clasificación de muestras de esférulas con papaína inmovilizada.

Muestra	Nombre	Característica
A	QUITOSANO + GLUTARALDEHIDO + ENZIMA (x0)	Sin actividad enzimática
B	QUITOSANO + GLUTARALDEHIDO + ENZIMA ^{FQ} (x0)	Sin actividad enzimática
C	QUITOSANO + GLUTARALDEHIDO + ENZIMA (x4)	Con actividad enzimática (04 ciclos)

^{FQ} Papaína extraída de látex de papaya (*Carica papaya*) pasada por malla de 20 micras.

Cada muestra contuvo 10 unidades. Luego se les agregó 2 mL de NaOH 0,05N (inicio del desprendimiento proteico en la esférula), pasado 15 minutos de reposo se aplicó presión mecánica con una varilla de vidrio. Después, las muestras fueron sometidas a sonicación por 1 minuto (figura 26). Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos. Las muestras problema fueron tomadas de la fase sobrenadante.

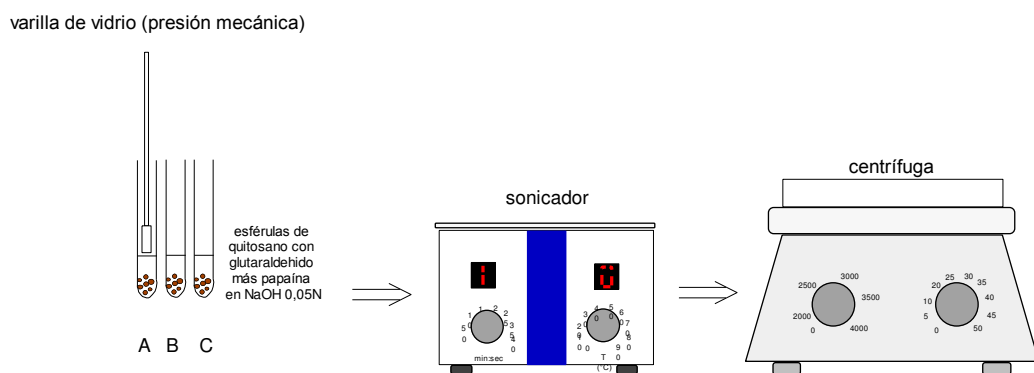


Figura 26. Tratamiento de muestras de esférulas con enzimas*.

- **Determinación de concentración de papaína.** Se tomaron muestras de 800 μL , a las cuales se les añadieron 300 μL de NaOH 0,05N y 900 μL de solución Bradford 2 (figura 27). Esta determinación se realizó por espectroscopía visible a $\lambda=545\text{ nm}$. Previamente, se estableció según la tabla 9 la curva de calibración a la misma longitud de onda antes mencionada (figura 28).

Tabla 9. Curva de calibración para la determinación de concentración de papaína.

	Proteína BSA 50 ppm ^A (μL)	Proteína (μg)	NaOH 0,05N (μL)	Bradford 2 (μL)	H ₂ O ^B (μL)
1	0	0	200	900	900
2	20	1	180	900	900
3	40	2	160	900	900
4	70	3,5	130	900	900
5	100	5	100	900	900

^A Solución estándar de 50 ppm (Proteína BSA/NaOH 0,05N): 100 μL Prot. BSA + 900 μL NaOH 0,05N.

^B Agua de grado HPLC.

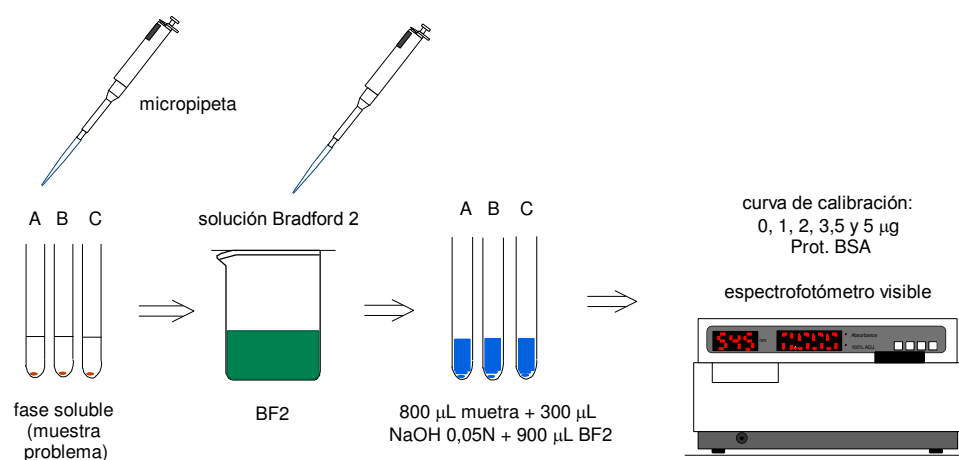


Figura 27. Determinación de concentración de papaína en esférulas de quitosano.

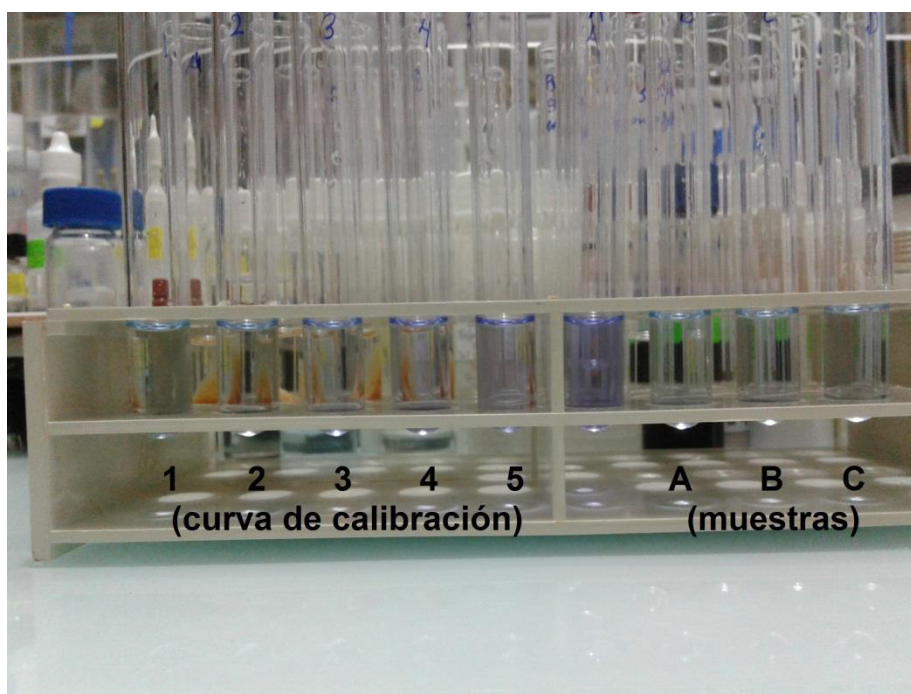


Figura 28. Muestras y curva de calibración (determinación de concentración de papaína).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PAPAÍNA

- **Actividad de papaína inmovilizada y en solución.** Se realizó la determinación de concentración de proteínas (caseína) no hidrolizadas por espectroscopia visible. Paralelamente se obtuvo la curva de calibración a 550 nm (figura 29).

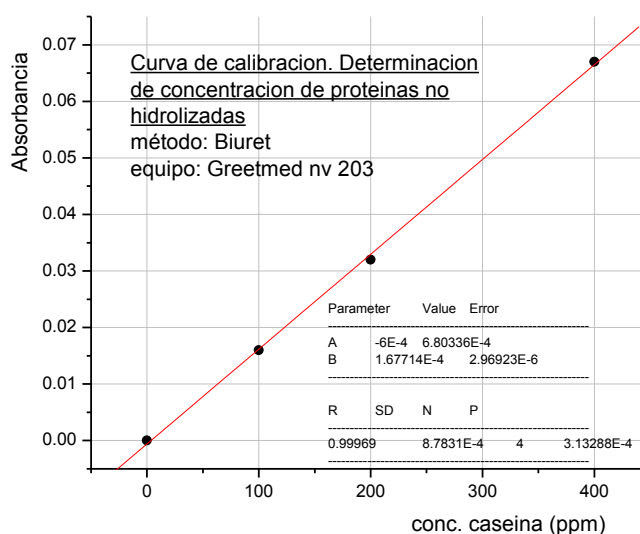


Figura 29. Curva de calibración para determinación de concentración de proteínas no hidrolizadas por método de Biuret a 550 nm*.

*Para cada ensayo de actividad enzimática a 100 y 1000 ppm se efectuó con su respectiva curva estándar.

A manera de ejemplo, las absorbancias a 550 nm de las soluciones proteicas diluidas para la determinación mencionada quedan expuestas por medio de la tabla 10.

Tabla 10. Absorbancias a 550 nm de soluciones de proteínas no hidrolizadas

Tiempo	Abs. sol. A	Abs. sol. B	Abs. sol. C
0 min	0,049	0,049	0,046
15 min	0,048	0,032	0,045
30 min	0,049	0,028	0,042
60 min	0,050	0,022	0,039

Así, de la extrapolación de la ecuación de la recta obtenida de la curva estándar se determinó la concentración de proteínas no hidrolizadas (tabla 11), de las cuales empleando la ecuación (3.1.1.) se calculó la concentración de proteínas hidrolizadas a partir de la concentración de sustrato de caseína de 1000 ppm.

Tabla 11. Concentración de proteínas no hidrolizadas

	Papaína inmov. 100 mg/mL	Papaína inmov. 1000 mg/mL	Papaína 100 mg/mL sol.	Papaína 1000 mg/mL sol.
Tiempo (min)	Prot. No Hidrol. (ppm)	Prot. No Hidrol. (ppm)	Prot. No Hidrol. (ppm)	Prot. No Hidrol. (ppm)
0	372,97	350,94	295,24	294,48
15	359,46	306,92	194,05	294,48
30	325,68	288,05	170,24	
60	271,62	206,29	134,52	760,74

$$\text{Conc. Prot. Hidrolizadas} = 1000 \text{ mg/L} - \text{Conc. Prot. No hidrolizadas} \quad (3.1.1.)$$

Obtenidos los resultados de concentración (tabla 12) se procedió a calcular las actividades enzimáticas respectivas.

Tabla 12. Concentraciones de proteínas hidrolizadas

	Papaína inmov. 100 mg/mL	Papaína inmov. 1000 mg/mL	Papaína 100 mg/mL sol.	Papaína 1000 mg/mL sol.
Tiempo (min)	Prot. Hidrol. (mg/mL)	Prot. Hidrol. (mg/mL)	Prot. Hidrol. (mg/mL)	Prot. Hidrol. (mg/mL)
0	627,03	649,06	704,76	705,52
15	640,54	693,08	805,95	705,52
30	674,32	711,95	829,76	257,67
60	728,38	793,71	865,48	239,26

Para el cálculo de actividades enzimáticas ⁶⁵ en PU/mg se utilizó la ecuación (3.1.2.).

$$PU/mg = \frac{(A \times C \times 2,4)}{W} \quad (3.1.2.)$$

Dónde:

A = Actividad enzimática según la Norma de Referencia de Papaína USP en PU/mg

C = Concentración en mg/mL de proteínas hidrolizadas.

W = masa en mg de enzima x 2 en la preparación (2 mL de solución). W_{enz} = 1,15 mg

2,4 = Volumen total del sistema sustrato, enzima y buffer pH 7,00.

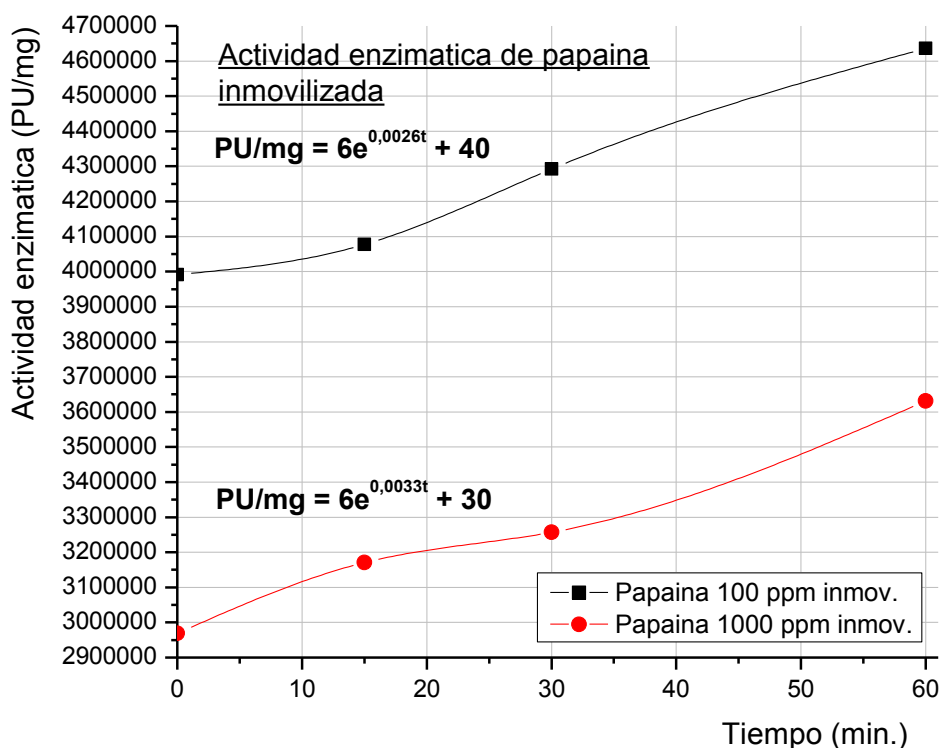
Teniendo de dato que la actividad enzimática según la Norma de Referencia es

6100 PU/mg para la papaína se obtuvieron las actividades enzimáticas de papaína inmovilizada como de papaína en solución según la tabla 13.

Tabla 13. Actividades enzimáticas de papaína inmovilizada y en solución

Tiempo (min.)	Actividad enzimática (PU/mg)			
	Papaína 100 mg/mL inmov.	Papaína 1000 mg/mL inmov.	Papaína 100 mg/mL sol.	Papaína 1000 mg/mL sol.
0	3991182,26	2969449,50	4485950,61	4490788,17
15	4077186,35	3170841,00	5130046,98	4490788,17
30	4292193,40	3257171,25	5281602,78	4725091,83
60	4636297,04	3631223,25	5508968,35	4842275,48

De esta manera se obtuvieron los gráficos comparativos de actividad enzimática frente al tiempo de hidrólisis (figura 30).



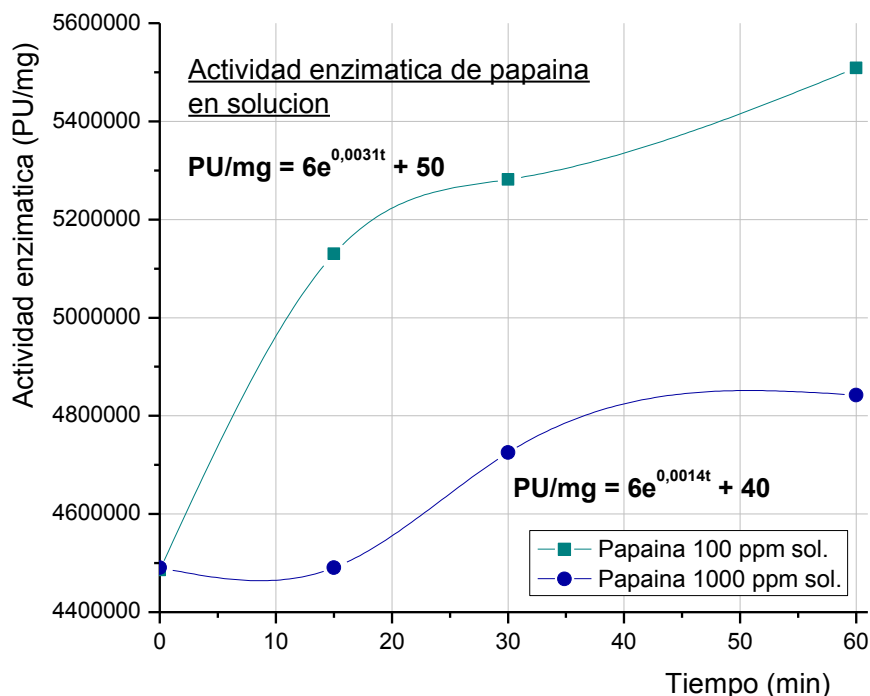


Figura 30. Graficas comparativas de actividad enzimática de papaína.

A partir de la comparación de ecuaciones exponenciales presentes en las gráficas observamos que la actividad enzimática de papaína inmovilizada es menor en 10 PU/mg respecto de la actividad enzimática de papaína en solución. Además se observa también una mayor actividad enzimática en concentraciones enzimáticas de 100 ppm. De estos resultados se procedió a determinar la concentración de papaína inmovilizada en un baño de solución a 100 mg/mL tal como se verá más adelante en el inciso (3.3.2.).

3.2. CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO

3.2.1. Titulación potenciométrica

Se obtuvo la curva de titulación por valoración potenciométrica, así mismo de ésta se efectuó la primera derivada (figura 31), dando los puntos de inflexión. Estos puntos correspondieron a los puntos de equivalencia (volúmenes de equivalencia). Finalmente, se calculó el grado de desacetilación de quitosano aplicando la ecuación (1.2.1.1.).

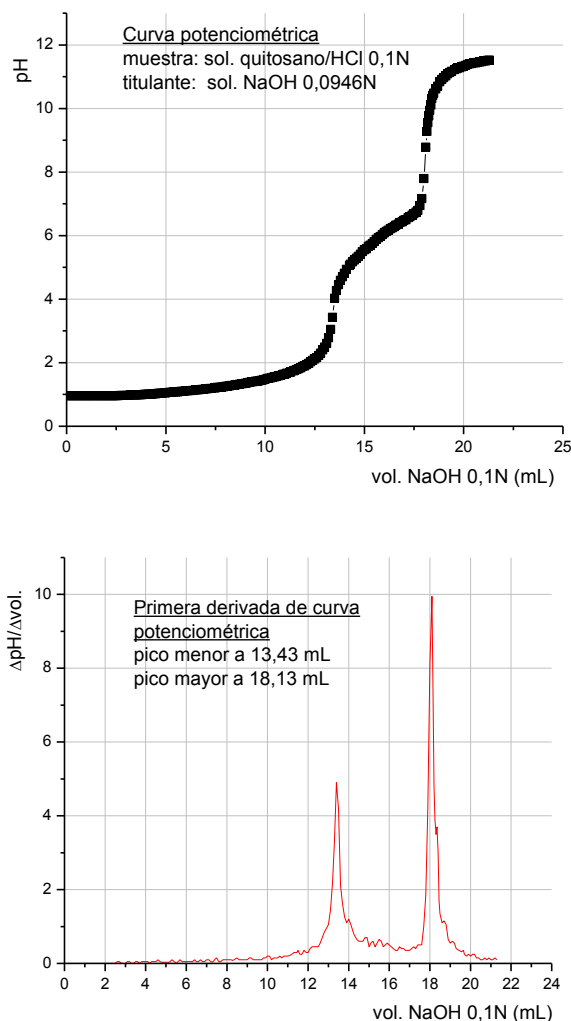


Figura 31. Curva de titulación y gráfica de primera derivada.

Reemplazando en la ecuación mencionada se tuvo:

$$DD = \frac{16,1 \times (18,13 - 13,43) \text{ mL} \times 0,0946 \text{ N}}{0,1022 \text{ g}} = 70,04\%$$

El valor de 70,04% indica el grado de desacetilación de quitosano en polvo. Este valor cumple con la funcionalidad (soporte) para el estudio realizado, ya que los quitosanos presentan grados de desacetilación superiores ¹⁸ a 60%.

3.2.2. Determinación de concentración de quitosano

En la figura 32 se muestra la gráfica de influencia de la temperatura sobre la viscosidad relativa de las soluciones de quitosano. Esta influencia ha permitido observar el

comportamiento de interacción molecular entre el polímero catiónico y el ácido fuerte diluido.

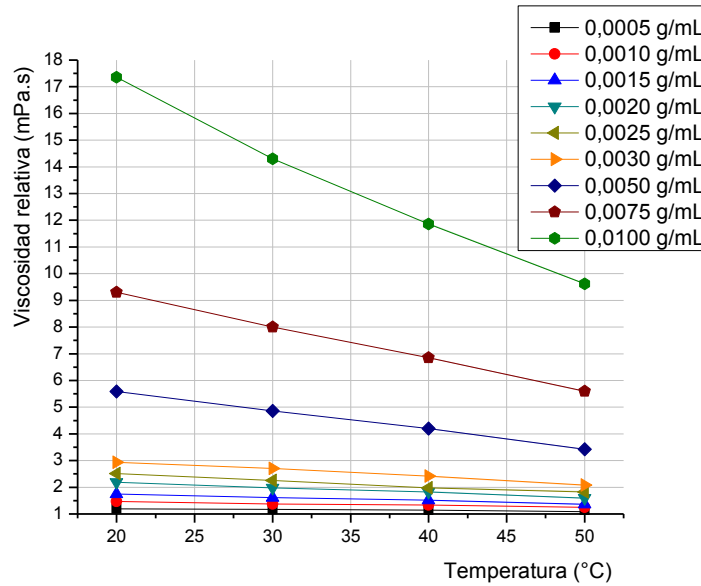


Figura 32. Influencia de la temperatura de equilibrio del sistema sobre la viscosidad relativa de soluciones de quitosano.

También en esta misma figura se observa que en la temperatura de 20°C existe un buen comportamiento lineal entre las concentraciones y las viscosidades hasta 0,0030 g/mL mostrado en la figura 33. Es de notar que viscosidades superiores a 0,0030 g/mL la dependencia de temperatura con la viscosidad tiene una tendencia parabólica.

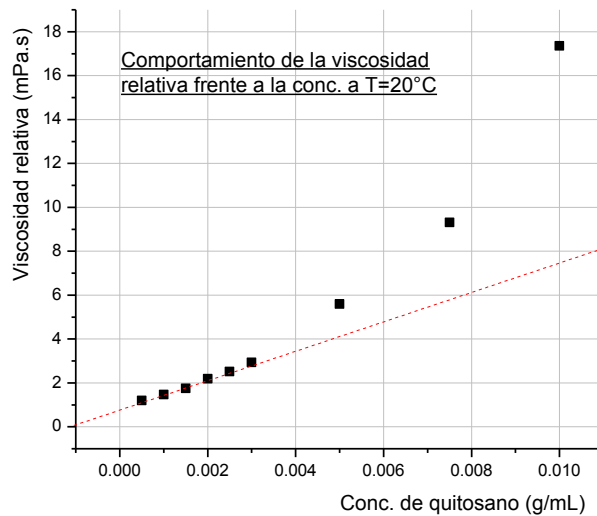


Figura 33. Comportamiento de la viscosidad relativa respecto de la concentración a T=20°C.

Realizando una regresión lineal de seis concentraciones desde 0,0005 hasta 0,0030 g/mL, se demostró que existe una dependencia lineal cuyo valor de r^2 fue de 0,992 y valor de pendiente 701,13 (figura 34).

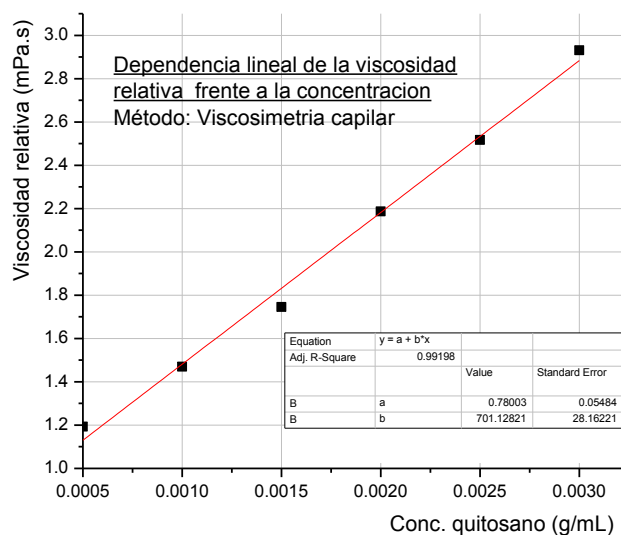


Figura 34. Dependencia lineal de la viscosidad relativa frente a la concentración para soluciones diluidas de quitosano a 20°C.

3.3. ESFÉRULAS DE QUITOSANO

- **Diámetro de esférula.** Al realizar mediciones por quintuplicado obtuvo el valor promedio de $2,268 \pm 0,0005$ mm de diámetro (ϕ) para esférulas sin glutaraldehído, mientras que para esférulas con glutaraldehído se obtuvo $2,771 \pm 0,0005$ mm. La diferencia de valores pone en evidencia que la interacción con glutaraldehído incrementó, ligeramente, las dimensiones de las esférulas (figura 35).

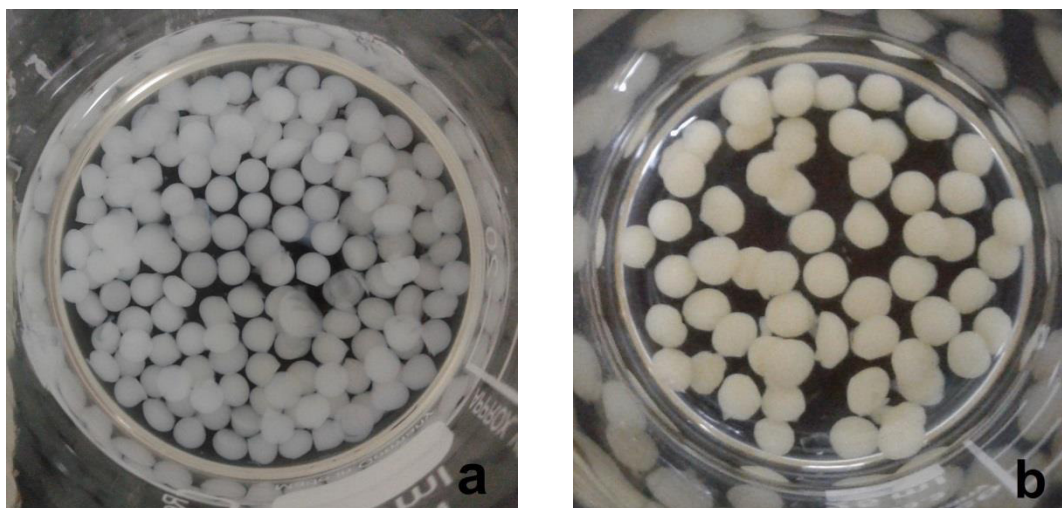


Figura 35. (a) Esférulas sin glutaraldehído. (b) Esférulas con glutaraldehído.

Adicionalmente a través de las imágenes se observa que las esférulas sin glutaraldehído son de color blanco mientras las que son impregnadas con glutaraldehído son de color amarillo.

3.3.1. Concentración de quitosano

Se estableció la curva de calibración para la determinación de la concentración de quitosano por unidad esférica tal como se indica en la figura 36.

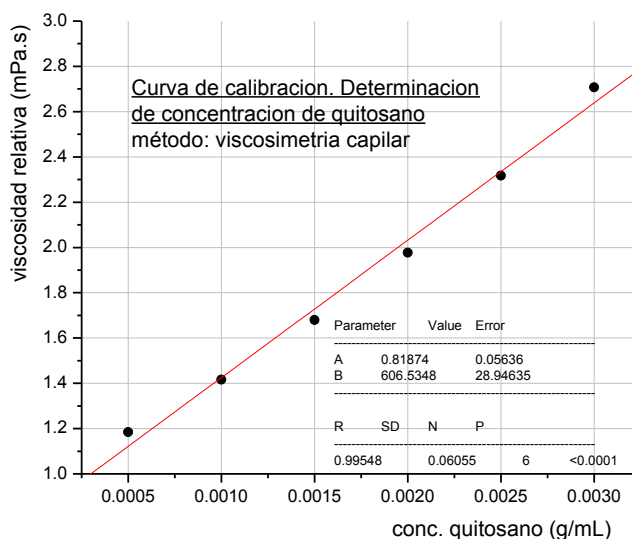


Figura 36. Curva de calibración empleada en la determinación de concentración de quitosano en esférulas.

De la última gráfica realizada la regresión lineal se obtuvo la ecuación (3.3.1.1.).

$$\eta_r = 0,81874 + 606,5348C \quad (3.3.1.1)$$

Medidos los tiempos de flujo del solvente y de las soluciones problema se procedió a calcular las viscosidades relativas, cuyos coeficientes fueron reemplazados en la ecuación 3.3.1.1. Se obtuvo los valores de concentración de quitosano tal como muestra la tabla 14.

Tabla 14. Valores de concentración de quitosano obtenidos.

Muestra	W _{muestra} (g)	pH	η_r (mPa.s)	Concentración (g/mL)	Conc. Por cada esférula (g/mL)
Q _E -A	0,0912	1,25	1,21026	$6,455 \times 10^{-4}$	$6,455 \times 10^{-5}$
Q _E -B	0,0945	1,24	1,21641	$6,556 \times 10^{-4}$	$6,556 \times 10^{-5}$
Q _E -C	0,0834	1,25	1,20410	$6,353 \times 10^{-4}$	$6,353 \times 10^{-5}$

Obtenidas las concentraciones se evidencia que la concentración de quitosano promedio por esférula fue de $6,455 \times 10^{-5}$ g/mL equivalente a 0,0645 mg/mL.

3.3.2. Concentración de papaína

Se estableció la curva de calibración a 545 nm para determinar la concentración de papaína en esférulas, según figura 37.

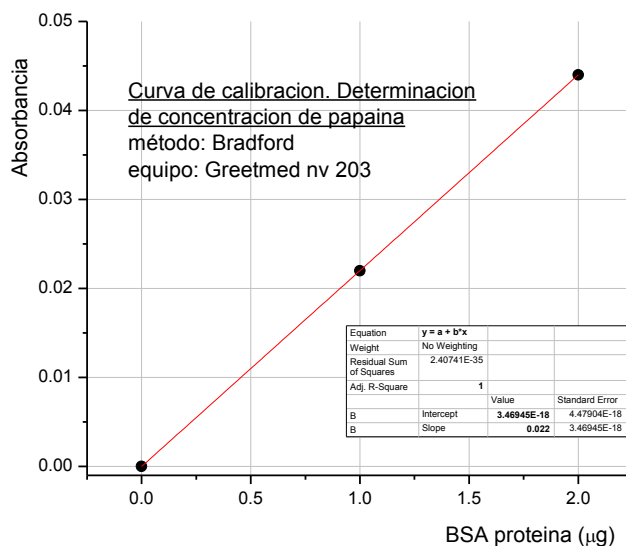


Figura 37. Curva de calibración para la determinación de concentración de papaína inmovilizada en esférulas a 545 nm.

Se obtuvieron absorbancias a 545 nm, de las cuales empleando la ecuación de recta de la curva de calibración (3.3.2.1.) y la ecuación (3.3.2.2.) se obtuvo las concentraciones de papaína en las esférulas, según la tabla 15.

$$Abs = 0,022\mu g \quad (3.3.2.1.)$$

$$C = \frac{\mu g \times 10^{-3} mg}{W_{muestra} \times 10^{-3} kg} \quad (3.3.2.2.)$$

Tabla 15. Datos de muestras y concentraciones de papaína.

Muestra	W_{muestra} (g)	Abs.	Concentración (mg/kg)
A	0,1700	0,045	12
B	0,1200	0.049	18,56
C	0,1792	0,047	11,92

De acuerdo con la clasificación de muestras se deduce que la esférula sólo logró concentrar 12 mg/kg de enzima patrón dentro de sus poros; 18,56 mg/kg para la esférulas con enzima nativa y 11,92 mg/kg para esférulas con papaína reutilizada.

CONCLUSIONES

1. Se logró efectuar un procedimiento de preparación de esférulas de quitosano por precipitación sobre una solución de NaOH 2,0M utilizando una pipeta Pasteur de 1 mL cuyo diámetro promedio fue $2,268 \pm 0,0005$ mm, y que después de someterlas a un baño de solución de glutaraldehído al 3% v/v su diámetro incrementó hasta $2,771 \pm 0,0005$ mm. Estos resultados así como las diferencias de manera cualitativa se observan en las figuras 17, 18 y 35 de las páginas 38, 39 y 55, respectivamente.
2. Sobre estos soportes esferulares se logró inmovilizar la enzima papaína, la cual fue inmovilizada por adsorción química y por reticulación. Este criterio se sustenta en los conceptos de técnicas de inmovilización descritos en las páginas 30 y 31 del capítulo 1 además de la evidencia experimental descrita en la figura 18 de la página 39 donde se observa a estas esférulas pasar de un color amarillo a marrón.
3. Así mismo, después de realizado el estudio comparativo de actividad enzimática de papaína inmovilizada respecto de la actividad enzimática de papaína en solución empleando el método de Biuret se obtuvo que la actividad de papaína inmovilizada es menor en 10 PU/mg frente a la actividad de papaína en solución, por lo cual en base a la segunda ley de la termodinámica cuya definición mencionada en la página 12 se relaciona con la entropía se deduce que en la actividad enzimática de papaína inmovilizada existe mayor preponderancia del factor entrópico frente al factor cinético sustentado en la comparación gráfica en la figura 30 de la página 51. Por tanto se demuestra que la actividad enzimática de papaína inmovilizada en soportes semisólidos mejorará por efectos de la entropía respecto de la actividad enzimática de papaína sistemas en solución.
4. Complementariamente, por empleo de los métodos por viscosimetría capilar y de Bradford amparados por los valores de las tablas 13 y 14 se logró determinar que las esférulas poseen 0,0645 mg/mL de concentración promedio de quitosano, las cuales lograron inmovilizar entre 12 a 18,56 mg/kg (miligramos de papaína por kilogramo de quitosano) después de un baño de solución de papaína a 100 mg/mL. Por tanto con lo descrito anteriormente y lo expuesto de forma adicional se concluye también que la actividad enzimática muestra resultados óptimos en condiciones de dilución infinita.

RECOMENDACIONES

Si bien por criterios de formación académica se estudió la actividad enzimática de la papaína inmovilizada para un tiempo de reacción de 60 minutos; se puede prolongar este tiempo a fin obtener mayor cantidad de datos en la toma de muestras con la finalidad de obtener gráficas de actividad para mayor análisis.

Se puede reforzar este estudio comparativo si se realiza ensayos de actividad enzimática en enzimas proteolíticas de la misma familia de la papaína sobre la caseína u otro sustrato proteico y en general, para otras enzimas proteolíticas. Del mismo modo se puede emplear adicionalmente otras técnicas de caracterización superficial sobre las esférulas obtenidas tales como la microscopía electrónica de barrido (SEM) a fin de determinar el tamaño de poro presente en cada esférula.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos en esta tesis a un nivel microanalítico se pueden proponer nuevas investigaciones acerca de los procesos de inmovilización enzimática cuyo factor catalítico está relacionado con parámetros termodinámicos como la entalpía y entropía de reacción en donde estos valores pueden ser determinados con exactitud bajo el diseño y construcción de sensores calorimétricos.

BIBLIOGRAFÍA

1. S. H. Maron, C. F. Prutton. "Fundamentos de fisicoquímico", primera edición, Editorial Limusa, México D. F., México, 1984, 56-57, 77, 278-283.
2. Gilbert W. Castellan. Fisicoquímica, segunda edición, Editorial Addison-Wesley Iberoamericana, México D. F., México, 1987, 95-96, 297-299, 798-800, 882-883, 992-993.
3. Ira N. Levine. Fisicoquímica. Volumen 2, quinta edición, Editorial McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid, España, 2004, 616, 723-725, 1121-1126.
4. T. van Geel. (1981, Feb 26). Unit 9: *Equilibrium and Advanced Thermodynamics-Balance in Chemical Reactions*. Retrieved from <https://www.learner.org/courses/chemistry/text/>.
5. L. Qinghua, X. Chen, Q. Tang, H. Cai, Y. Qin, B. He, M. Li, S. Jin, Z. Liu. Enhanced photovoltaic performances of quasi-solid-state dye-sensitized solar cells using a novel conducting gel electrolyte. *J. Power Sources*, 2016, 329: 57-71.
6. D. Frenkel. Entropy-driven phase transitions. *Physica A*, 1999, 263: 26-38.
7. M. N. Ravi. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.*, 2000, 46: 1-27.
8. I. Aranaz, M. Mengíbar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, A. Heras. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr. Chem. Biol.*, 2009, 3: 203-230.
9. P. Sorlier, A. Denuzière, C. Viton, A. Domard. Relation between the Degree of Acetylation and the Electrostatic Properties of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules*, 2001, 2: 765-772.
10. A. Tolaimate, J. Desbrières, M. Rhazi, A. Alagui, M. Vincendon, P. Vottero. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer*, 2000, 41: 2463-2469.
11. Elson Santiago de Alvarenga, Cristiane Pereira de Oliveira, Carlos Roberto Bellato. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydr. Polym.*, 2010, 80: 1155-1160.
12. K. M. Vårum, M. H. Ottøy, O. Smidsrød. Acid hydrolysis of chitosans. *Carbohydr. Polym.*, 2001, 46: 89-98.
13. V. Yu. Noviov. Acid Hydrolysis of Chitin and Chitosan. *Russ. J. Appl. Chem.*, 2004, 77 (3): 484-487.
14. C. J. Knill, J. F. Kennedy, J. Mistry, M. Miraftab, G. Smart, M. R. Grocock, H. J. Williams. Acid hydrolysis of commercial chitosans. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2005, 80: 1291-1296.
15. G. L. Clark, A. F. Smith. X-ray Diffraction Studies of Chitin, Chitosan, and Derivatives. *J. Phys. Chem.*, 1936, 40 (7): 863-879.
16. Se-Kwon Kim. Marine Biomaterials: Characterization, Isolation and Applications, first edition, CRC Press Editorial, Boca Raton, Florida, 2013, 51.
17. L. Pérez-Álvarez, L. Ruiz-Rubio, and J. L. Vilas-Vilela. Determining the Deacetylation Degree of Chitosan: Opportunities to Learn Instrumental Techniques. *J. Chem. Educ.*, 2018, 95 (6): 1022-1028.
18. H. Hernández, E. Águila, O. Flores, E. L. Viveros, E. Ramos. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*. 2009, 22 (3): 57-60.
19. E. Santiago, C. Pereira, C. Bellato. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydr. Polym.*, 2010, 80: 1155-1160.

20. R. H. Chen, M. L. Tsaih. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of chitosans in dilute HCl solution. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1998: 135-141.
21. K. V. S. N. Raju, M. Yaseen. A new equation for estimating $[\eta]$ from single-viscosity measurement in dilute solution. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1992, 45: 677-681.
22. D. J. Macquarrie, J. J. E. Hardy. Applications of Functionalized Chitosan in Catalysis. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2005, 44: 8499-8520.
23. F. Tian, Y. Liu, K. Hu, B. Zhao. Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide. *Carbohydr. Polym.*, 2004, 57: 31-37.
24. M. H. Mahaninia, L. D. Wilson. A Kinetic Uptake Study of Roxarsone Using Cross-Linked Chitosan Beads. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2017, 56 (7): 1704-1712.
25. M. H. Mahaninia, L. D. Wilson. Cross-linked chitosan beads for phosphate removal from aqueous solution. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2016, 133 (5): 42949.
26. K. Itoyama, H. Tanibe, T. Hayashi, Y. Ikada. Spacer effects on enzymatic activity of papain immobilized onto porous chitosan beads. *Biomaterials*, 1994, 15 (2): 107-112.
27. R. A. Alberty. Biochemical Thermodynamics and Rapid-Equilibrium Enzyme Kinetics. *J. Phys. Chem. B*, 2010, 114 (51): 17003-17012.
28. Allan G. Splittgerber. The catalytic function of enzymes. *J. Chem. Educ.*, 1985, 62 (11): 1008-1012.
29. David L. Nelson, Michael M. Cox. Lehninger: Principios de Bioquímica, quinta edición, Editorial Omega, Barcelona, 2007, 184-187, 190-191, 490-491.
30. J. Åqvist, M. Kazemi, G. V. Isaksen, B. O. Brandsdal. Entropy and Enzyme Catalysis. *Acc. Chem. Res.*, 2017, 50 (2): 199-207.
31. W. P. Jencks. Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the circe effect. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 2006, 43: 219-410.
32. R. Wolfenden, M. J. Snider. The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts. *Acc. Chem. Res.*, 2001, 34: 938-945.
33. T. C. Bruice, F. C. Lightstone. Ground State and Transition State Contributions to the Rates of Intramolecular and Enzymatic Reactions. *Acc. Chem. Res.*, 1999, 32: 127-136.
34. C. J. Halkides. Introducing Michaelis-Menten Kinetics through Simulation. *J. Chem. Educ.*, 2007, 84 (3): 434-437.
35. A. Cornish-Bowden. Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. *Perspectives in Science*, 2014, 1 (1-6): 74-87.
36. S. Martínez Cuesta, S. A. Rahman, N. Furnham, and J. M. Thornton. The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophys. J.*, 2015, 109 (4): 1-5.
37. E. Silvia Coaquira, Jesús A. Cjuno H. Actividades enzimáticas a diversas diluciones del látex de papaya proveniente de Junín (Perú). Manuscrito no publicado. Departamento académico de Fisicoquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
38. Y. Lin, W. J. Welsh. Molecular modeling of substrate-enzyme reactions for the cysteine protease papain. *J. Mol. Graph.*, 1996, 14 (2): 62-72.
39. R. Arnon. [14] Papain. *Methods Enzymol.*, 1970, 19: 226-244.
40. I. G. Kamphuis, K. H. Kalk, M.B. Swarte, J. Drenth. Structure of Papain Refined at 1,65 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, 1984, 179: 233-256.
41. M. J. Harrison, N. A. Burton and I. H. Hillier. Catalytic Mechanism of the Enzyme Papain: Predictions with a Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Potencial. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119: 12285-12291.

42. P. Alpay, D.A. Uygun. Usage of immobilized papain for enzymatic hydrolysis of proteins. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2015, 111: 56-63.
43. B. Lönnerdal, E. Forsum, Casein content of human milk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1985, 41 (1): 113-120.
44. H. M. Jr. Farrell, R. Jimenez-Flores, G. T. Bleck, E. M. Brown, J. E. Butler, L. K. Creamer, C. L. Hicks, C. M. Hollar, K. F. Ng-Kwai-Hang, H. E. Swaisgood. Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. *J. Dairy Sci.*, 2004, 87 (6): 1641-1674.
45. L. Pepper, H. M. Jr. Farrell. Interactions Leading to Formation of Casein Submicelles. *J. Dairy Sci.*, 1982, 65 (12): 2259-2266.
46. J. C. Mercier, G. Brignon, B. Ribadeau-Dumas. Structure primaire de la caséine κ B bovine. *Eur. J. Biochem.*, 1973, 35: 222-235.
47. A. K. Balls, S. R. Hoover. The milk-clotting action of papain. *J. Biol. Chem.*, 1937, 121: 737-745.
48. R. Benítez, A. Ibarz, J. Pagan. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.*, 2008, 42 (2): 227-236.
49. Food Chemicals Codex, fifth edition, The National Academies Press, Washington D. C., 2004: 922-923.
50. N. S. Astrof, G. Horowitz. Protein Colorimetry Experiments That Incorporate Intentional Discrepancies and Historical Narratives. *J. Chem. Educ.*, 2018, 95 (7): 1198-1204.
51. P. Sherovski, G. Stojković, N. Ristovska. Development, validation and application of first derivative spectroscopy ratio method for estimation of Bradford assay. *Anal. Biochem.*, 2018, 558: 35-40.
52. T. Zor, Z. Selinger. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.*, 1996, 236: 302-308.
53. X. X. Han, L. Chen, J. Guo, B. Zhao, Y. Ozai. Coomassie Brilliant Dyes as Surface-Enhanced Raman Scattering Probes for Protein-Ligand Recognitions. *Anal. Chem.*, 2010, 82: 4102-4106.
54. K Mosbach. Immobilized enzymes. *FEBS Lett.*, 1976, 62: 80-95.
55. M. Arroyo. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharm.*, 1998, 39 (2): 23-39.
56. D. M. Liu, J. Chen, Y. P. Shi. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *Trends Anal. Chem.*, 2018, 102: 332-342.
57. A. L. Kjøniksen, B. Nyström, C. Iversen, T. Nakken, O. Palmgren, T. Tande. Viscosity of Dilute Aqueous Solutions of Hydrophobically Modified Chitosan and Its Unmodified Analogue at Different Conditions of Salt and Surfactant Concentrations. *Langmuir*, 1997, 13: 4948-4952.
58. J. Desbrieres. Viscosity of Semiflexible Chitosan Solutions: Influence of Concentration, Temperature, and Role of Intermolecular Interactions. *Biomacromolecules*, 2002, 3: 342-349.
59. S. E. Harding. The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 1997, 68 (2/3): 207-262.
60. E. A. El-Hefian, E. S. Elgannoudi, A. Mainal, A. H. Yahaya. Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. *Turk. J. Chem.*, 2010, 34: 47-56.
61. E. A. El-Hefian, R. A. Khan, A. H. Yahaya. Study of the Parameters Affecting the Viscosity of Chitosan Solutions. *J. Chem. Soc. Pak.*, 2008, 30 (4): 529-531.

62. Y. Zhou, L. Wang, T. Wu, X. Tang, S. Pan. Optimal immobilization of β -glucosidase into chitosan beads using response methodology. *Electron. J. Biotechnol.*, 2013: 1-13.
63. Ş. A. Çetinus, H. N. Öztop. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, 32: 889-894.
64. R. Barreiro-Iglesias, R. Coronilla, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo. Preparation of chitosan beads by simultaneous crosslinking/insolubilisation in basic pH: Rheological optimization and drug loading/release behavior. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2005, 24: 77-84.
65. Enzyme Development Corporation (212) 736-1580. Plant Proteolytic Analytical Method (FCC-PU). Retrieved from: www.enzymedevelopment.com/es/assays/papain/.